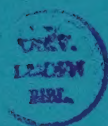


ORGANISATION, STRUKTUR UND EXPRESSION
VON GENEN FÜR STABILE RNS AUS ARCHAEBAKTERIEN

GÜNTER WICH

Disbui. München

1988



ORGANISATION, STRUKTUR UND EXPRESSION
VON GENEN FÜR STABILE RNS AUS ARCHAEBAKTERIEN

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

vorgelegt von
GÜNTER WICH
aus München

Januar 1988

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1988

STATISTIK

STATISTIK DER BEVÖLKERUNG

I. Bevölkerung der Provinz und Flensburg	100
II. Bevölkerung der Städte	10
1. Flensburg	10
2. Langeland	10
III. Bevölkerung der Kreise	10
1. Kreis Langeland	10
2. Kreis Langeland	10
3. Kreis Langeland	10
4. Kreis Langeland	10
5. Kreis Langeland	10
6. Kreis Langeland	10
7. Kreis Langeland	10
8. Kreis Langeland	10
9. Kreis Langeland	10
10. Kreis Langeland	10
11. Kreis Langeland	10
12. Kreis Langeland	10
13. Kreis Langeland	10
14. Kreis Langeland	10
15. Kreis Langeland	10
16. Kreis Langeland	10
17. Kreis Langeland	10
18. Kreis Langeland	10
19. Kreis Langeland	10
20. Kreis Langeland	10
21. Kreis Langeland	10
22. Kreis Langeland	10
23. Kreis Langeland	10
24. Kreis Langeland	10
25. Kreis Langeland	10
26. Kreis Langeland	10
27. Kreis Langeland	10
28. Kreis Langeland	10
29. Kreis Langeland	10
30. Kreis Langeland	10
31. Kreis Langeland	10
32. Kreis Langeland	10
33. Kreis Langeland	10
34. Kreis Langeland	10
35. Kreis Langeland	10
36. Kreis Langeland	10
37. Kreis Langeland	10
38. Kreis Langeland	10
39. Kreis Langeland	10
40. Kreis Langeland	10
41. Kreis Langeland	10
42. Kreis Langeland	10
43. Kreis Langeland	10
44. Kreis Langeland	10
45. Kreis Langeland	10
46. Kreis Langeland	10
47. Kreis Langeland	10
48. Kreis Langeland	10
49. Kreis Langeland	10
50. Kreis Langeland	10
51. Kreis Langeland	10
52. Kreis Langeland	10
53. Kreis Langeland	10
54. Kreis Langeland	10
55. Kreis Langeland	10
56. Kreis Langeland	10
57. Kreis Langeland	10
58. Kreis Langeland	10
59. Kreis Langeland	10
60. Kreis Langeland	10
61. Kreis Langeland	10
62. Kreis Langeland	10
63. Kreis Langeland	10
64. Kreis Langeland	10
65. Kreis Langeland	10
66. Kreis Langeland	10
67. Kreis Langeland	10
68. Kreis Langeland	10
69. Kreis Langeland	10
70. Kreis Langeland	10
71. Kreis Langeland	10
72. Kreis Langeland	10
73. Kreis Langeland	10
74. Kreis Langeland	10
75. Kreis Langeland	10
76. Kreis Langeland	10
77. Kreis Langeland	10
78. Kreis Langeland	10
79. Kreis Langeland	10
80. Kreis Langeland	10
81. Kreis Langeland	10
82. Kreis Langeland	10
83. Kreis Langeland	10
84. Kreis Langeland	10
85. Kreis Langeland	10
86. Kreis Langeland	10
87. Kreis Langeland	10
88. Kreis Langeland	10
89. Kreis Langeland	10
90. Kreis Langeland	10
91. Kreis Langeland	10
92. Kreis Langeland	10
93. Kreis Langeland	10
94. Kreis Langeland	10
95. Kreis Langeland	10
96. Kreis Langeland	10
97. Kreis Langeland	10
98. Kreis Langeland	10
99. Kreis Langeland	10
100. Kreis Langeland	10

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	8
I. Verwendete Organismen und Plasmide	8
II. Medien und Anzucht	11
1. Medien	11
2. Anzuchtbedingungen	13
III. Genetische Methoden	14
1. Isolation von DNS	14
a) Chromosomale DNS	14
b) Plasmid-DNS	14
2. Gelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten aus Gelen	15
a) Agarose-Gelelektrophorese	15
b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese	15
3. Klonierung von DNS-Fragmenten	16
a) Restriktionsreaktionen	16
b) Herstellung glatter Enden an DNS-Fragmenten	16
c) Ligation von DNS-Fragmenten	16
d) Klonierung synthetischer Oligonukleotide	17
e) Transformation von E. coli Zellen	17
4. Markierung von DNS-Fragmenten mit ³² P-Phosphat	17
a) Nicktranslation von DNS-Fragmenten	17
b) Endmarkierung von DNS-Fragmenten	18
5. Hybridisierungsexperimente	18
a) Hybridisierung von DNS-Fragmenten	18
b) Koloniehybridisierungen	19
6. DNS-Sequenzierungsmethoden	19
a) Sequenzierung durch basenspezifische chemische Spaltung	19
b) Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	19
c) Computeranalyse der DNS-Sequenz	20

7. Isolierung von RNS	20
8. Gelelektrophorese von RNS-Molekülen	20
a) Agarose-Gelelektrophorese	20
b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
9. S1-Kartierungsanalysen	21
10. Radioaktive Markierung von RNS-Molekülen	22
a) 5' Endmarkierung von RNS-Molekülen	22
b) In vitro "cap" Markierung von RNS	22
11. In vitro Transkription klonierter tRNS-Gene	23
12. RNS-Sequenzierung durch "Primer-Extension"	23
IV. Exonuklease III - "Footprinting"-Analysen	24
V. Versuche zur in vitro Prozessierung von Introns aus tRNS-Genen von Thermoproteus	25
VI. Analyse eines Thermoproteus-Restriktionsenzym	26
VII. Besondere Chemikalien und deren Bezugsquellen	26
 C. ERGEBNISSE	 27
I. tRNS-Gene und ihre Organisation in Methanococcus	27
1. Subklonierung und Restriktionskartierung von tRNS-Klonen aus Methanococcus vannielii	27
2. Bestimmung der Nukleotidsequenz der klonierten DNS-Fragmente	29
3. Identifizierung von tRNS-Genen innerhalb der sequenzierten Bereiche	33
II. Sequenzierung eines 5S rRNS/tRNS Gen-Clusters aus Methanococcus voltae	37
1. Organisation der rRNS-Gene in Methanococcus voltae	37
2. Sequenzanalyse des "extra" 5S rRNS-Genbereiches	41
3. Sequenzanalyse des 5S rRNS-Gens des 16S-23S-5S rRNS-Operons	46
III. Kartierung der Transkriptionssignale für verschiedene Gene stabiler RNS aus M. vannielii	48

1. Kartierung des Transkriptionsstarts einer rRNS-Transkriptionseinheit	48
2. Nachweis des primären Transkripts durch in vitro "cap" Markierung	51
3. Kartierung des Transkriptionsterminations-Bereiches eines rRNS-Operons	55
4. Kartierung des Transkriptionsstarts zweier tRNS-Transkriptionseinheiten	57
5. Konservierte DNS-Sequenzen im Bereich der Transkriptionsinitiation und -termination	59
IV. Bestimmung des Bindungsbereiches einer RNS-Polymerase aus <i>M. vannielii</i> an Gene stabiler RNS	62
1. Exonuklease III-Protektionsanalysen eines rRNS-Operons und eines tRNS-Operons aus <i>M. vannielii</i>	62
2. Exonuklease III-Protektionsanalysen der Methanococcus RNS-Polymerase an einem rRNS-Operon aus <i>E. coli</i>	66
3. Der Bindungsbereich der Methanococcus RNS-Polymerase	67
V. tRNS-Gene und ihre Organisation in dem thermophilen Archaeobakterium <i>Thermoproteus tenax</i>	69
1. Klonierung und Charakterisierung von tRNS-Genen aus <i>Thermoproteus tenax</i>	69
2. Identifizierung von tRNS-Genen innerhalb des sequenzierten Bereichs	71
3. Bestimmung der Lage des Introns in zwei tRNS ^{Ala} -Genen mittels S1-Kartierung und "Primer-Extension" Analyse	77
VI. Kartierung des Transkriptionsinitiations-Bereiches bei Genen stabiler RNS in <i>Thermoproteus tenax</i>	79
1. Kartierung des Transkriptionsstarts einer rRNS-Transkriptionseinheit und zweier tRNS-Gene	79
2. Konservierte DNS-Sequenzen im Bereich der Transkriptionsinitiation	81

VII. Versuche zur Prozessierung der tRNS-Introns	83
1. In vitro Transkription von tRNS-Genen aus Thermoproteus	83
2. Prozessierungsversuche der in vitro erzeugten tRNS-Vorläufermoleküle	86
VIII. Charakterisierung einer Restriktionsendonuklease aus dem extrem thermophilen Organismus Thermoproteus tenax	88
1. Bedingung der Reaktion	88
2. Erkennungssequenz des Restriktionsenzym	90
D. DISKUSSION	94
I. Organisation und Struktur der Gene stabiler RNS in Methanococcus und Thermoproteus	94
II. Signale der Transkription	100
1. Promotorstrukturen der Gene stabiler RNS aus Methanococcus und Thermoproteus	100
2. Konsensuselemente archaebakterieller Promotoren	104
3. Prozessierungssignale stabiler RNS in Methanococcus und Thermoproteus	107
4. Terminationssignale	111
III. Eine Restriktionsendonuklease aus T. tenax	112
D. ZUSAMMENFASSUNG	114
E. LITERATURVERZEICHNIS	117

Abkürzungen

A	Adenosin
amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
C	Cytidin
Ci	Curie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanosin
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
Pipes	Piperazin-N,N'-bis (Ethansulfonsäure)
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymidin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris pH-Wert mit HCl eingestellt
tRNS	transfer Ribonukleinsäure
U	Uridin

Die Darstellung von DNS-Sequenzen erfolgt von 5'-3' Richtung, jedes Nukleotid wird entsprechend seiner Base mit A, T, G, C bezeichnet.

A. EINLEITUNG

Basierend auf einer Publikation von Chatton et al. (1937) war es zu einer allgemein akzeptierten Vorstellung geworden, daß alle Lebewesen einer von zwei Gruppen zugeordnet werden können: Prokaryonten oder Eukaryonten. Es bestand Übereinstimmung darüber, daß Prokaryonten und Eukaryonten phylogenetisch kohärente Taxa darstellen. Wie bereits durch den Namen ausgedrückt, wurden Prokaryonten als die primitivere Organisationsform angesehen; die Eukaryonten sollten sich aus einem prokaryontischen Vorläufer entwickelt haben (Stanier, 1970).

1977 wurde offenbar, daß dieses Konzept der Evolution der Organismen einer grundlegenden Revision bedurfte. Indem er 16S rRNS-Sequenzen als "molekulare Chronometer" verwandte, zeigte Carl Woese mit seinen Mitarbeitern, daß die Dichotomie der Entwicklungslinien in Eu- und Prokaryonten nicht länger aufrechterhalten werden konnte (Woese und Fox, 1977; Fox et al., 1977). Seine Untersuchungen führten zu zwei prinzipiellen Änderungen unseres Verständnisses der Entwicklung der Organismen:

- Die Prokaryonten sind keine einheitliche phylogenetische Gruppe, sondern sie müssen in zwei primäre Abstammungslinien aufgespalten werden. Die beiden prokaryontisch organisierten Organismengruppen stehen dabei einander phylogenetisch nicht näher als jede von ihnen den Eukaryonten.
- Evolution ist nicht ein einfaches Fortschreiten von den "primitiven" Prokaryonten zu höher entwickelten Eukaryonten, sondern die drei Entwicklungslinien haben sich unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt.

Es gibt drei eigenständige, monophyletische, primäre Abstammungslinien: die Abstammungslinie der Eubakterien, der Archaeobakterien und der Eukaryonten.

Abbildung 1 zeigt einen Stammbaum der Organismen, wie er aus 16S rRNS-Sequenzen abgeleitet werden kann (Woese, 1987). Die Aufteilung in die drei phylogenetisch distinkten Organismengruppen ist deutlich zu erkennen. Der Stammbaum ist ohne "Wurzel": Es kann bis jetzt nicht entschieden werden, wo der Verzweigungspunkt des Vorläuferorganismus der drei Entwicklungslinien liegt. Das Konzept der Archaeobakterien als drittes primäres "Ur"-Reich wird auch durch Stammbäume aus 23S rRNS-Sequenzen und durch erste Proteingensequenzen bestätigt (Kjems et al., 1987; Lechner und Böck, 1987; Auer, persönliche Mitteilung; Zillig, persönliche Mitteilung).

Innerhalb der Archaeobakterien gibt es eine tiefe phylogenetische Verzweigung in die Gruppe der thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterien und in die der halophilen/methanogenen Archaeobakterien (Abb. 1).

Stimuliert durch diese Erkenntnisse, zogen die Archaeobakterien in den vergangenen Jahren großes wissenschaftliches Interesse auf sich. Man hoffte, daß ihre Erforschung zum Verständnis früher zellulärer Evolutionsprozesse beiträgt. Zum anderen durften, da Eukaryonten, Eubakterien und Archaeobakterien unabhängige Evolutionslinien darstellen, neue und ungewöhnliche metabolische und molekularbiologische Mechanismen erwartet werden.

Inzwischen ist eine Reihe von Charakteristika, die spezifisch für Archaeobakterien sind, beschrieben:

- Das Murein der Zellwände in Eubakterien ist durch verschiedene andere Zellwandpolymere ersetzt (Kandler, 1979).
- Archaeobakterien besitzen Lipide, die sich durch Ätherverknüpfung und isoprenoidartige Struktur der Seitenketten auszeichnen (Langworthy et al., 1982).

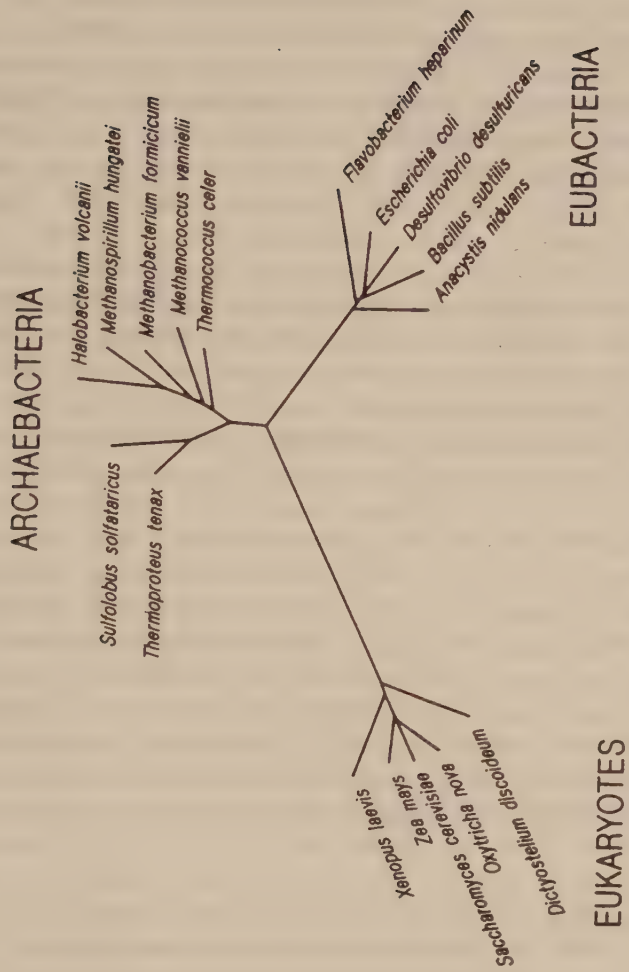


Abb. 1: Aus 16S rRNS-Sequenzvergleichen abgeleiteter Stammbaum der Organismen (Woese und Olsen, 1986).

- Die Sekundärstrukturen der ribosomalen RNS weisen neben eubakteriellen und eukaryontischen eine ganze Reihe spezifisch archaebakterieller Eigenschaften auf (siehe Fox, 1985). rRNS wie tRNS unterliegen archaebakterien-spezifischen Modifizierungen (Woese et al., 1978; Gupta und Woese, 1980).
- Die Wirkungsmuster von Inhibitoren der Proteinsynthese sind in Archaeobakterien, Eukaryonten und Eubakterien verschieden (Böck und Kandler, 1985).
- Archaeobakterien besitzen eine Reihe ungewöhnlicher Coenzyme (Whitman, 1985).

Neben diesen spezifisch archaebakteriellen Eigenschaften findet man eine große Anzahl von Eigenschaften, die Archaeobakterien entweder mit Eubakterien oder mit Eukaryonten teilen.

Solche "eubakteriellen" Eigenschaften sind vor allem die prokaryontische Zellorganisation, die Verwendung von Shine-Dalgarno-Sequenzen bei der Translationsinitiation und die Organisation von Genen in polycistronischen Transkriptionseinheiten (siehe Dennis, 1986).

Mit Eukaryonten teilen die Archaeobakterien das Vorhandensein von Introns in Genen stabiler RNS (Kaine et al., 1983; Kaine, 1987; Dennis et al., 1986; Kjems und Garrett, 1985), die Sequenz und Eigenschaften der Translations-Elongationsfaktoren (Gehrmann et al., 1986; Lechner und Böck, 1987), eine Initiation der Proteinsynthese mit Methionin statt mit Formylmethionin (Woese et al., 1978) und eine Sequenz und Struktur der DNS-abhängigen RNS-Polymerase, die hohe Homologie zu den eukaryontischen Enzymen aufweist (Zillig et al., 1985; Zillig, persönliche Mitteilung).

Einer der wichtigen Unterschiede zwischen eukaryontischer und eubakterieller Zellorganisation liegt in der Struktur und in den Mechanismen der Transkriptionsinitiation und -termination. Eubakterien besitzen ein einziges RNS-Polymerase "Core"-Enzym. Eubakterielle Promotoren zeichnen sich oft durch den Besitz zweier konservierter Primärstrukturelemente in der DNS aus. Diese beiden Signalsequenzen, das Heptanukleotid 5' TATAATG 3'

und das Hexanukleotid $5' \text{TTGACA} 3'$, liegen 5' der betreffenden Gene in einem definierten Abstand von 10 beziehungsweise 35 Basenpaaren zum Transkriptionsstart. Die Transkription terminiert in der Regel an einer intramolekularen "Bäumchen"-Struktur der DNS, die von einer Anzahl dT-Resten gefolgt wird (Rosenberg und Court, 1979).

Eukaryonten hingegen benutzen drei verschiedene Spezies von RNS-Polymerasen, die verschiedene Gentyphen transkribieren. Die RNS-Polymerase I ist spezifisch für die Gene der großen ribosomalen RNS, die RNS-Polymerase II für Gene, die für Proteine kodieren, während die RNS-Polymerase III nur 5S rRNS- und tRNS-Gene transkribiert. Die drei Polymerasen besitzen keine gemeinsame Erkennungssequenz in der DNS. Bei Promotoren der RNS-Polymerase B existiert die konservierte DNS-Sequenz $5' \text{TATA} \overset{\text{T}}{\text{AAA}} 3'$ (die TATA-Box) etwa 25 Basenpaare oberhalb des Startnukleotids der mRNA (Corden et al., 1980). Die RNS-Polymerase C hingegen erkennt in den kodierenden Bereichen gelegene Primärstrukturelemente als Signale der Initiation. Sie terminiert in einem Oligo-dT-Bereich nach den Strukturgenen.

Die verschiedenen Mechanismen und Strukturen der Transkriptionsinitiation und -termination in Eukaryonten und Eubakterien stellen die Frage, wie dieses zentrale Problem der Genexpression im dritten Organismenreich, bei den Archaeobakterien gelöst ist. Diese Frage war auch deshalb interessant, da Archaeobakterien wie Eubakterien wahrscheinlich nur ein RNS-Polymerase "Core"-Enzym besitzen, dieses jedoch - wie erwähnt - große strukturelle Ähnlichkeit mit den eukaryontischen Enzymtypen besitzt (Zillig et al., 1985).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war eine Reihe mutmaßlicher Promotor- und Terminatorsequenzen für Archaeobakterien postuliert (Hui und Dennis, 1984; Hamilton und Reeve, 1985; Müller et al., 1985). Eine Konsensusstruktur konnte jedoch weder für verschiedene Gene in einem Organismus noch für Gene verschiedener Spezies erreicht werden. Dafür konnte eine Reihe von Gründen verantwortlich sein:

- Die untersuchten Gene gehören zu unterschiedlichen regulatorischen Gruppen, und es ist aus Studien in Eubakterien bekannt, daß sich unterschiedliche Regulation oft auch in einer hohen Diversität der Promotorstrukturen widerspiegelt.
- Die verglichenen Gene waren aus verschiedenen Archaeobakterien, und es war nicht bekannt, wie hoch die evolutionäre Divergenz in Transkriptionssignalen innerhalb der verschiedenen Gruppen der Archaeobakterien ist.
- Die Anzahl der Daten war für eine rein vergleichende Analyse der 5' und 3' Gen-flankierenden DNS-Bereiche noch gering.

Um diese Probleme zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Analysen zur Transkription der Gene stabiler RNS von Archaeobakterien durchgeführt. Diese Untersuchungen boten eine Reihe von Vorteilen bei der Suche nach archaeobakteriellen Transkriptionssignalen:

- Es ist gerechtfertigt anzunehmen, daß diese Gene koordiniert kontrolliert werden und gleichen regulatorischen Prinzipien gehorchen.
- Diese Gene werden mit hohen Raten transkribiert, eine Eigenschaft, die eine Kartierung der Transkriptionsstart und -endpunkte erleichtern sollte.
- Es ist in einem einzigen Organismus möglich, eine statistisch signifikante Anzahl gleichregulierter Transkriptionseinheiten auf Konsensuselemente zu untersuchen.
- Stabile RNS-Gene kodieren für universelle Zellkomponenten, so daß Transkriptionssignale gleichartiger Gene in verschiedenen Archaeobakterien verglichen werden konnten.

Für diese Studien wurden das methanogene Archaeobakterium *Methanococcus* (M.) *vannielii* und das thermophile, schwefel-abhängige Archaeobakterium *Thermoproteus* (T.) *tenax* ausgewählt, um Vertreter beider phylogenetischer Äste der Archaeobakterien zu erfassen. *Methanococcus* bot den zusätzlichen Vorteil, daß für diesen Organismus eine gereinigte RNS-Polymerase vorlag und erste Evidenz für spezifische in vitro Transkription an homologen Genen gezeigt werden konnte (Thomm, persönliche Mit-

teilung). Damit konnte in diesem System die RNS-Polymerase-bindungsregion (d.h. der Promotor) auch durch direkte Bindungsanalysen untersucht werden.

Neben neuen Erkenntnissen zur Struktur der Transkriptions-signale archaebakterieller Gene durften diese Untersuchungen auch weitere Einblicke in archaebakterielle Genstruktur und -organisation erwarten lassen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Verwendete Organismen und Plasmide

Tabelle 1: Organismen

Organismen	Genotyp	Referenz
Methanococcus (M.) vannielii		DSM 1224
Methanococcus (M.) voltae Stamm PS		DSM 1537
Thermoproteus (T.) tenax KraI		Zellen erhalten von W. Zillig (Martinsried)
Escherichia (E.) coli HB101	hsdR, hsdM, recA13, supE44, lacZ4, leuB6, proA2, thi-1, rpsL	Boyer und Roulland- Dussoix (1969)
E. coli RRI	leuB6, proA2, thi-1, Δ (lac-proAB), xyl-5, galk2, mt1-1, ara-14, rpsL20, hsdS20, λ^- , F'(proAB, lacI ^q , Δ M15, traD36)	Rüther (1982)
E. coli JM101	supE, Δ (lac-proAB), thi, F'(proAB, lacI ^q , Δ M15, traD36)	Yanisch-Perron et al. (1985)
E. coli JM105	hsdR4, endA, sbcB15, Δ (lac-proAB), thi, rpsL, F'(proAB, lacI ^q , Δ M15, traD36)	Yanisch-Perron et al. (1985)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

a) Vektorplasmide

Plasmid	Größe (kb)	maßgeblicher Phänotyp	Referenz
pBR322	4,36	amp ^R , tet ^R	Bolivar et al. (1977)
pBR328	4,9	amp ^R , tet ^R , cam ^R	Covarrubias et al. (1977)
pUR2	2,68	amp ^R , lac'IPOZ' α	Rüther (1980)
pUC19	2,7	amp ^R , lac'IPOZ' α	Yanisch-Perron et al. (1985)
pJB76	4,2	amp ^R , lac'IPOZ' α enthält die T7 und SP6- Promotorregion und f ₁ ori- Region	International Biotechnologies, New Haven

b) rekombinante Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pMV1	10,9	enthält ein 8,3 kb EcoRI-Fragment aus dem M. vanthielii Genom mit rRNS-Genen	Jarsch et al. (1983)
pMV15	13,2	enthält ein 10,8 kb EcoRI-Fragment aus dem M. vanthielii Genom mit rRNS-Genen	Jarsch et al. (1983)
pMV4	10,4	enthält ein 7,6 kb EcoRI-Fragment aus dem M. vanthielii Genom mit rRNS- und tRNS-Genen	Jarsch et al. (1983)
pMV1/1	5,7	enthält ein 3,0 kb EcoRI-Fragment aus dem M. vanthielii Genom mit tRNS-Genen	Wich (1984)
pMV2/1	6,4	enthält ein 3,7 kb EcoRI-Fragment aus dem M. vanthielii Genom mit tRNS-Genen	Wich (1984)

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pMV2/2	6,5	enthält ein 3,8 kb EcoRI-Fragment aus dem <i>M. vanniellii</i> Genom mit trNS-Genen	Wich (1984)
pMV3/1	8,4	enthält ein 5,7 kb EcoRI-Fragment aus dem <i>M. vanniellii</i> Genom mit trNS-Genen	Wich (1984)
pMT11	6,5	1,62 kb EcoRI/ClaI-Fragment aus pMV1/1 in pBR328	diese Arbeit
pMT21	4,9	0,55 kb ClaI-Fragment aus pMV2/1 in pBR322	diese Arbeit
pMT22	6,4	1,48 kb EcoRI/ClaI-Fragment aus pMV2/2 in pBR328	diese Arbeit
pMT31	5,1	0,75 kb ClaI-Fragment aus pMV31 in pBR322	diese Arbeit
pS1	6,9	enthält ein 4,2 kb HindIII-Fragment aus dem <i>M. voltae</i> Genom mit rRNS- und trNS-Genen	Plasmide erhalten v.L.Sibold(Paris)
pS2	5,35	enthält ein 2,65 kb HindIII-Fragment aus dem <i>M. voltae</i> Genom mit rRNS-Genen	Plasmide erhalten v.L.Sibold(Paris)
pS3	7,9	enthält ein 5,2 kb HindIII-Fragment aus dem <i>M. voltae</i> Genom mit rRNS- und trNS-Genen	Plasmide erhalten v.L.Sibold(Paris)
pTT1	9,3	enthält ein 4,9 kb PstI-Fragment aus dem <i>T. tenax</i> Genom mit rRNS-Genen	Leinfelder et al. (1985)
pTT2/5	8,7	enthält ein 6,0 kb BamHI-Fragment aus dem <i>T. tenax</i> Genom mit trNS-Genen	diese Arbeit
pTT22/6	4,1	enthält ein 1,4 kb BamHI-Fragment aus dem <i>T. tenax</i> Genom mit trNS-Genen	diese Arbeit
pTT25	7,1	enthält ein 4,4 kb HindIII-Fragment aus dem <i>T. tenax</i> Genom mit trNS-Genen	diese Arbeit
pTT31/14	5,4	enthält ein 2,7 kb PstI-Fragment aus dem <i>T. tenax</i> Genom mit trNS-Genen	diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pTT25/1	4,0	1,3 kb Sal-Fragment aus pTT25 in pUC19	diese Arbeit
pJBT2	4,3	enthält das 103 bp trNS^{Met} -Gen aus pTT2/5 unter Kontrolle des SP6-Promotors	diese Arbeit
pJBT22	4,3	enthält eine in vitro synthetisierte 94 bp trNS^{Ala} -Gensequenz unter Kontrolle des SP6-Promotors	diese Arbeit

II. Medien und Anzucht

1. Medien

Die folgenden Medien wurden zur Anzucht der Mikroorganismen verwendet (die Angaben beziehen sich auf einen Liter Medium).

a) *E. coli*:

Vollmedium: Luria-Bertani-Medium (LB)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

TYGES-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	2 g

Minimalmedium: Werkmann-Minimalmedium

Na_2HPO_4	8,9 g
KH_2PO_4	13,6 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,014 g
MgSO_4	0,25 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g

Zur Verwendung als feste Nährböden wurde den Medien 15 g/l Agar zugesetzt. Selektivmedien wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	100 mg/l
Chloramphenicol	30 mg/l

b) Methanococcus:

Medium nach Douglas et al. (1980):

KH_2PO_4	0,5	g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,4	g
NaCl	18	g
NH_4Cl	0,4	g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,05	g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,002	g
Hefeextrakt	1,0	g
Bacto Casiton	2,0	g
Natriumacetat	1,0	g
Spurenelementlösung SL6	6	ml
(DSM Katalog 1977, S. 240)		
Vitaminlösung nach Wolin et al. (1963)	10	ml
NaHCO_3	5	g
NiCl_2	0,0012	g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,00035	g
Resazurin	0,001	g
Ampicillin	0,1	g
Na_2S	0,5	g
Cysteinhydrochlorid	0,5	g

Der pH wurde vor Zugabe von Ampicillin und vor Reduktion mit Natriumsulfid und Cystein auf einen Wert von 7.7 eingestellt.

c) Thermoproteus:

Das Medium entspricht mit kleinen Modifikationen dem von Brock et al. (1983) beschriebenen:

KH_2PO_4	0,28 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,07 g
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,8 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	4,5 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,22 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,05 mg
$\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,03 mg
$\text{VOSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,03 mg
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 mg
Hefeextrakt	0,2 g
Trypton	0,2 g
Schwefel	0,5 g
Na_2S	0,5 g
Cystein	0,5 g

Der pH wird vor der Zugabe von Na_2S und Cystein auf einen Wert von 5.0 eingestellt.

2. Anzuchtbedingungen

E. coli Zellen wurden im kleinen Maßstab (bis 500 ml) in Erlenmeyerkolben bei 37°C in Wasserbadschüttlern (New Brunswick G76) angezogen. Wurden größere Mengen benötigt, so wurde ein 10 l Fermenter (Braun Melsungen, Biostat) benutzt.

Methanogene Bakterien wurden anaerob in Serumflaschen (Mache-rey-Nagel) angezogen. Die anaerobe Medienbereitung erfolgte mit Vereinfachungen nach der von Balch et al. (1976) vorgeschla-genen Technik. 20 ml des oben beschriebenen Mediums wurden in Serumflaschen (100 ml) eingefüllt, die Flaschen gasdicht ver-

geschlossen und die Gasatmosphäre gegen 80 % H_2 , 20 % CO_2 ausgetauscht. Nach Autoklavieren wurde das Medium mit Cystein und Na_2S reduziert und mit gasdichten Spritzen beimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37°C in Wasserbadschüttlern. Zur Großanzucht wurden 10 l Fermenter unter kontinuierlicher Begasung mit 80 % H_2 , 20 % CO_2 anaerob betrieben.

Die Thermoproteus-Anzucht wurde im 100 l Fermenter (Bio-engineering) anaerob unter N_2 -Atmosphäre bei 80°C durchgeführt. Zur Ernte der Zellen aus Fermenteranzuchten wurde Durchlaufzentrifugation (Westfalia) oder Querstromfiltration (Filtron, Duraporekassette Millipore, Porengröße 0,2 μm) benutzt.

III. Genetische Methoden

1. Isolation von DNS

a) Chromosomale DNS

Chromosomale DNS wurde aus den Organismen nach der von Saito und Miura (1963) beschriebenen Phenolextraktionsmethode isoliert. Eine Lysozymbehandlung ist zum Aufbrechen archaebakterieller Zellwände nutzlos; die Destabilisierung der Zellwände von Methanococcus und Thermoproteus erfolgte deshalb durch Einfrieren und Auftauen und durch die Einwirkung von Phenol.

b) Plasmid-DNS

Plasmidschnellpräparationen und Großpräparationen wurden nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) mit den von Maniatis et al. (1982) empfohlenen Modifikationen durchgeführt.

Im Falle von Plasmidisolationen im präparativen Umfang wurde zur zusätzlichen Reinigung eine Gleichgewichtszentrifugation im Cäsiumchloriddichtegradienten angeschlossen.

2. Gelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten aus Gelen

a) Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNS-Restriktionsfragmenten erfolgte in horizontalen 0,7 % bis 1,8 % Agarosegelen, wobei als Laufpuffer TBE (90 M Tris/Cl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8.0; Peacock und Dingman, 1969) diente. Die Proben wurden in "Agarosebeads" (Schaffner, 1976) aufgetragen.

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus normalen Agarosegelen wurde nach der von Benson (1984) vorgeschlagenen Methode verfahren. Die Gelmatrix wurde dabei durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört, die DNS durch Phenolextraktion gewonnen. Alternativ wurde die Elektrophorese in sogenannter "low gelling temperature" Agarose (Sigma, Typ VII) durchgeführt, aus der DNS-Fragmente durch einfaches Ausschmelzen rückgewonnen werden können (Wieslander, 1979).

b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNS-Fragmente unter einer Größe von 100 bp wurden in 6 % bis 12 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Auch hier diente TBE-Puffer als Gel- und Laufpuffer.

Die durch Sequenzreaktionen erhaltenen DNS-Fragmente wurden in 6 %, 8 % und 20 % Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff (Maxam und Gilbert, 1980) oder auf 6,6 % Gelen mit einem kontinuierlichen Salzgradienten (Schnier, persönliche Mitteilung) aufgetrennt.

Die Gele wurden mit einer Dicke von 0,1 bis 0,2 mm hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei 2.500 bis 3.000 V und, durch thermostatisierbare Glasplatten (LKB), bei konstanter Temperatur zwischen 60°C und 70°C durchgeführt.

Zur Reinigung synthetischer Oligonukleotide wurden ebenfalls Harnstoff-Acrylamidgele verwandt. Je nach Länge des Oligonukleotids wurden Acrylamidkonzentrationen von 8 % bis 20 % benutzt. Die Dicke präparativer Gele betrug 1,5 mm.

Die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen ist bei Maxam und Gilbert (1980) beschrieben.

3. Klonierung von DNS-Fragmenten

a) Restriktionsreaktionen

Plasmid- oder chromosomale DNS wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen inkubiert.

b) Herstellung glatter Enden an DNS-Fragmenten

5' Überhängende Enden an DNS-Fragmenten wurden durch DNS-Polymerase I (Klenow-Fragment) mit Desoxynukleotid-Triphosphaten aufgefüllt (Maniatis et al., 1982).

Restriktionsfragmente mit 5' oder 3' Überhängenden Enden konnten durch die einzelstrangspezifische "mung bean" Nuklease in glattendige Fragmente überführt werden (Laskowski, 1980). Zu diesem Zweck wurden 10 µg des jeweiligen DNS-Fragments 1 min lang mit 10 Einheiten "mung bean"-Nuklease bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) wurde die DNS durch Ethanolfällung gewonnen.

c) Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase wurde gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Verhältnis von DNS-Fragmenten zu Vektor DNS wurde nach Williams und Blattner (1980) eingestellt. Um eine Rezirkularisierung der Vektorfragmente zu minimieren, wurden Vektorfragmente mit 5' Überhängenden Restriktionsenden durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert (Ullrich et al., 1977).

d) Klonierung synthetischer Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Mertz (Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Zur in vitro Synthese eines tRNS-Gens aus Thermoproteus wären Oligonukleotide einer Größe von über 100 Basen nötig gewesen. Die Ausbeute an so langen Oligonukleotiden ist bei den üblichen Synthesemethoden sehr gering; deshalb wurde nach der bei Oliphant et al. (1986) beschriebenen Technik vorgegangen.

Zwei kürzere Oligonukleotide wurden so synthetisiert, daß die 15 jeweils 3' ständigen Nukleotide komplementäre Sequenzen aufwiesen. 1 µg bis 5 µg der Oligonukleotide wurden in 10 µl Hybridisierungspuffer (30 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 15 mM DTT, 0,1 mg/ml Gelatine) über die komplementären Endbereiche aneinanderhybridisiert. Die verbleibenden langen Einzelstrangbereiche wurden durch Polymerase I (Klenow-Fragment) mit dNTPs aufgefüllt. Vollständig doppelsträngige Reaktionsprodukte, die die beiden Oligonukleotideinheiten enthielten, wurden über 12 % Polyacrylamidgele gereinigt. Die doppelsträngige DNS wurde an den Enden mit Restriktionsnukleasen geschnitten, so daß sie für eine Ligation in Standardvektoren geeignet war.

e) Transformation von E. coli Zellen

E. coli Stämme wurden nach der CaCl₂-Methode von Cohen et al. (1972) mit Plasmid-DNS oder Ligationsansätzen transformiert.

4. Markierung von DNS-Fragmenten mit ³²P-Phosphat

a) Nicktranslaton von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden für Hybridisierungen über die gesamte Länge durch sogenannte Nicktranslation mit Hilfe von DNS-Polymerase I (Holoenzym) markiert (Maniatis et al., 1982). Die Nicktranslationsprodukte wurden über Sephadex G50 Minisäulen von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden abgetrennt.

b) Endmarkierung von DNS-Fragmenten

Nach Abspaltung der endständigen Phosphatgruppen mit alkalischer Kälberdarm-Phosphatase wurden DNS-Fragmente mittels T4-Polynukleotid-Kinase mit γ - ^{32}P -ATP an 5' Enden markiert (Maxam und Gilbert, 1980).

Entsprechend wurde bei der 5' Endmarkierung von Oligonukleotiden verfahren, jedoch konnte, da Oligonukleotide bei der Synthese ohne 5' Phosphatgruppe anfallen; die Phosphatasebehandlung entfallen.

Um 3' Enden an DNS-Fragmenten zu markieren, wurden 5' überstehende Restriktionsschnittstellen mit DNS-Polymerase I (Klenow-Fragment) und radioaktivem α - ^{32}P -dNTP aufgefüllt (Maniatis et al., 1982).

5. Hybridisierungsexperimente

a) Hybridisierung von DNS-Fragmenten

DNS-Restriktionsfragmente wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll, BA85) übertragen (Southern, 1975). Bei DNS-DNS-Hybridisierungen wurde 2 h bis 4 h in 5 x SSPE (1 x SSPE: 180 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA) mit 0,7 % Magermilchpulver (Johnson et al., 1984) zur Absättigung des Filters gegen unspezifische DNS-Bindung prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im 5 x SSPE, 0,7 % Magermilchpulver mit 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ radioaktiv markierter DNS.

Für RNS-DNS-Hybridisierungen wurde die Hybridisierung bei 37°C in 4 x SSPE mit 50 % Formamid ohne vorherige Prähybridisierung durchgeführt.

Gewaschen wurden die Filter 2 x 20 min mit 2 x SSPE, 0,25 % Magermilchpulver, 0,1 % SDS und 2 x 20 min mit 0,2 x SSPE, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur. Die Filter wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und mit Röntgenfilmen (X-Ray 90) exponiert.

b) Koloniehybridisierungen

Koloniehybridisierungen wurden nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) durchgeführt. Zur Amplifikation der zu untersuchenden Plasmide wurden E. coli Klone auf Nitrozellulosefiltern, die auf LB-Agar lagen, angezogen, die Filter auf LB-Agar mit 100 µg/ml Chloramphenicol transferiert und weitere 12 h bei 37°C bebrütet.

6. DNS-Sequenzierungsmethoden

a) Sequenzierung durch basenspezifische chemische Spaltung

Um DNS nach der chemischen Spaltungsmethode (Maxam und Gilbert, 1980) zu sequenzieren, sind DNS-Fragmente nötig, die spezifisch an einem DNS-Strang endmarkiert sind. Zu diesem Zweck wurden 3' oder 5' endmarkierte DNS-Fragmente (siehe Kap. 4/b) mit einem Restriktionsenzym asymmetrisch nachgespalten. Die nunmehr nur noch an einem Ende markierten Subfragmente wurden nach Auftrennung in "low gelling temperature" Agarose eluiert und zur Sequenzierung eingesetzt. Die basenspezifischen Spaltungsreaktionen waren die von Maxam und Gilbert (1980) empfohlenen, mit Ausnahme der A+G-Reaktion, die nach Gray et al. (1979) modifiziert wurde.

b) Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Alternativ zur chemischen Spaltungsmethode wurden Sequenzierungen nach der von Sanger et al. (1977) eingeführten Kettenabbruchsynthese durchgeführt. Die Modifikation von Chen und Seeburg (1985) machte die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid DNS möglich.

c) Computeranalyse der DNS-Sequenz

Zur digitalen Verarbeitung der erhaltenen Nukleotidsequenzen kamen zwei Computerprogramme zum Einsatz. Zum einen das von Larson und Messing (1983) entwickelte Programm "sequence analysis" (Version 3) und zum anderen das von Genofit (Genf, Schweiz) kommerziell vertriebene Programm PC-Gene, Release 5,1.

7. Isolierung von RNS

Gesamt-RNS aus *Methanococcus* und aus *Thermoproteus* Zellen wurde nach der heißen Phenol-Methode von Aiba et al. (1981) extrahiert. Eine weitere Reinigung von 5S rRNS- und tRNS-Molekülen erfolgte durch Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kap. 8) oder durch fraktionierte Isopropanolfällung (Kelmers et al. 1965).

8. Gelelektrophorese von RNS-Molekülen

a) Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Gesamt-RNS unter denaturierenden Bedingungen wurde das Formaldehyd-Agarose Gel-system von Lehrach et al. (1977) verwandt.

b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Elektrophorese von tRNS und 5S rRNS wurden denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele (7 M Harnstoff im Gel) nach Tomioka und Sugiyura (1984) benutzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen durch 30 sek Erhitzen auf 90°C in Harnstoffauftragepuffer (50 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 M Harnstoff, 0,05 % Bromphenolblau) denaturiert.

Die Extraktion von RNA aus Acrylamidgelen erfolgte nach der von Maxam und Gilbert (1980) beschriebenen Methode, wobei dem Elutionspuffer zur Hemmung von RNasen 0,1 % SDS zugesetzt wurde.

9. S1-Kartierungsanalysen

Initiations- und Terminationspunkt der Transkription wurden nach der von Berk und Sharp (1977) eingeführten Technik, modifiziert nach Weaver und Weissman (1979), bestimmt.

Etwa 50 µg Gesamt-RNS wurden zusammen mit 0,5 µg radioaktiv endmarkierter DNS durch zehnminütiges Erhitzen auf 85°C in 30 µl Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES pH 6.4, 80 % Formamid, 0,4 M NaCl und 1 mM EDTA) denaturiert. Durch dreistündiges Inkubieren bei einer Temperatur, die RNS-DNS-Hybride gegenüber DNS-DNS-Hybriden bevorzugt, wurden die entsprechenden RNS-DNS-Hybridisierungsprodukte gebildet. Die Temperatur dieser Hybridisierungsreaktion wurde nach Casey und Davidson (1977) berechnet. Nach der Hybridisierung wurde der Ansatz mit dem zehnfachen Volumen kaltem S1-Puffer (280 mM NaCl, 5 mM NaAcetat pH 4.6, 4,5 mM ZnSO₄ und 20 µg/ml Träger DNS) und 1.000 U/ml S1-Nuklease versetzt und 45 min bei 30°C inkubiert.

Um Introns in tRNS-Molekülen zu kartieren, wurde dieses Protokoll nach Favaloro et al. (1980) verändert. 0,1 µg 5' markierte DNS und 10 µg gereinigte Gesamt-tRNS aus *T. tenax* wurden hybridisiert. Die S1-Nuklease wurde mit 300 U/ml S1 für 45 min bei 37°C durchgeführt. Gleichzeitig wurde als Kontrolle ein Abbau bei 20°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird die Fähigkeit der Nuklease S1, endonukleolytisch im Hybrid ungepaarte Nukleinsäurebereiche zu schneiden, zumindest teilweise unterdrückt (Favaloro et al., 1980).

Wurde in vitro "cap-markierte" RNS für die S1-Kartierung benutzt, so wurde der S1-Reaktion eine weitere Behandlung mit der einzelstrangspezifischen RNase A (25 ng für 10 min bei 25°C) angeschlossen, um Hintergrundsignale unhybridisierter RNS zu vermindern (Venkatesan und Moss, 1981).

In Hybriden vor S1-Abbau geschützte DNS- oder RNS-Fragmente wurden auf Harnstoff-Acrylamidgelen aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

10. Radioaktive Markierung von RNS-Molekülen

a) 5' Endmarkierung von RNS-Molekülen

Analog zu DNS-Fragmenten (Kap. 4/b) konnten RNS-Moleküle durch den aufeinanderfolgenden Einsatz von alkalischer Phosphatase und Polynukleotidkinase mit γ - ^{32}P -ATP am 5' Ende markiert werden (Maniatis et al., 1982).

b) In vitro "cap" Markierung von RNS

Venkatesan und Moss (1981) beschrieben eine Methode, um primäre Transkripte in Gesamt-RNS am 5' Ende zu markieren. Das dazu verwendete Enzym ist eine aus Vaccinia Virus gereinigte RNS-Guanylyltransferase ("capping enzyme").

25 μg M. vanniellii Gesamt-tRNS wurden dazu in 100 μl Reaktionsgemisch (25 mM Tris/Cl pH 7.8, 2 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 300 μCi α - ^{32}P -GTP mit 600 Ci/mmol und 5 Einheiten RNS-Guanylyltransferase) bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (pH 8.0) auf eine Endkonzentration von 4 mM und von SDS auf eine Endkonzentration von 0,2 % unterbrochen. Die RNS wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und durch wiederholte Ethanol-fällung in Anwesenheit von 2,5 M Ammoniumacetat von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt. Nach einer letzten Fällung aus 0,3 M Natriumacetat wurde die RNS für S1-Kartierung, wie in Kapitel 9 beschrieben, eingesetzt.

11. In vitro Transkription klonierter tRNS-Gene

Zur in vitro Transkription klonierter Thermoproteus tRNS-Gene unter Kontrolle des SP6-Promotors wurde nach dem Protokoll von Melton et al. (1980) vorgegangen.

In 20 μ l Endvolumen wurden 0,5 μ g des zu transkribierenden DNS-Fragmentes, 2 μ l 10 x Transkriptionspuffer (200 mM Tris/Cl pH 7.5, 30 mM $MgCl_2$, 10 mM Spermidin, 50 mM NaCl, 100 mM DTT), je 500 μ M ATP, TTP und GTP und 50 μ Ci α - 32 P-CTP (400 Ci/mmol) miteinander vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 Einheiten SP6-Polymerase gestartet und der Ansatz wurde 45 min bei 40°C inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) wurde die Nukleinsäure durch mehrfaches Fällern aus 2,5 M Ammoniumacetat von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die Präzipitate wurden ohne Abtrennung der DNS-Fragmente direkt in Prozessierungsversuche eingesetzt.

12. RNS-Sequenzierung durch "Primer-Extension"

RNS-Moleküle können durch eine Adaptation der von Sanger et al. (1977) ursprünglich für DNS beschriebenen Kettenabbruchsynthese mit synthetischen Oligonukleotiden als Primer und Reverser Transkriptase direkt sequenziert werden (Lane et al., 1985). Diese Methode mußte jedoch im Falle der stark modifizierten und sekundärstruktureichen tRNS-Moleküle weitgehend verändert werden (Dingermann und Nerke, 1987).

Zur Analyse einer tRNS^{Ala} Sequenz aus T. tenax wurde, aus der DNS-Sequenz des Gens abgeleitet, ein zum 3' Ende der tRNS komplementäres Oligonukleotid (23 Basen) synthetisiert. 100 ng des 5' radioaktiv markierten Oligonukleotids wurden zusammen mit 20 μ g durch fraktionierte Fällung (siehe Kap. 7) gereinigter Gesamt-tRNS aus Thermoproteus durch Erhitzen auf 80°C denaturiert. Zur spezifischen Hybridisierung des Oligonukleotids wurde das Gemisch 3 h bei 50°C inkubiert. Der Hybridisierungspuffer war 250 mM KCl, 10 mM Tris/Cl (pH 8.3), 1 mM EDTA, das Reaktionsvolumen betrug 30 μ l. Nach der Hybridisierung

sierung wurden 50 µl eines Gemisches aus 24 mM Tris/Cl (pH 8.3), 16 mM MgCl₂, 8 mM DTT, je 0,4 mM dATP, dTTP und dCTP, 0,8 mM dGTP und 5 U Reverse Transkriptase zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 30°C und 60 min bei 37°C inkubiert.

Die Reaktionsprodukte, das heißt, die über das Oligonukleotid als Primer an der tRNS^{Ala} als Matrize synthetisierten cDNS-Moleküle, wurden über Harnstoff-Polyacrylamidgele gereinigt. Diese cDNS-Fragmente, die durch das Oligonukleotid endmarkiert waren, wurden nach der chemischen Spaltungsmethode sequenziert (siehe Kap. 6/a).

IV. Exonuklease III - "Footprinting"-Analysen

Exonuklease III-Protektionsexperimente wurden vor kurzem als sensitivere Alternative zu den klassischen DNase I-Footprintings beschrieben (Ptashne et al., 1976; Siebenlist et al., 1980; Wu, 1985). Diese Technik wurde zur Bestimmung des Bindungsbereichs einer RNS-Polymerase aus *M. vanniellii* benutzt.

Über Vorversuche wurde zunächst die Menge an Exonuklease III bestimmt, die für einen vollständigen Abbau des jeweiligen DNS-Fragments unter den gegebenen Versuchsbedingungen ohne RNS-Polymerase nötig war. Das Exonuklease-Protektionsexperiment selbst wurde in 100 µl eines Reaktionsgemisches, bestehend aus 5 pMolen (rRNS-Gen) beziehungsweise 6 pMolen (tRNS-Gen) 5' endmarkierter DNS in 20 mM Tris/Cl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 250 µg/ml Rinderserumalbumin und den jeweils angegebenen Mengen an RNS-Polymerase durchgeführt. In Kontrollexperimenten wurde Polymerasereinigungspuffer (Thomms und Stetter, 1985) statt Polymerase zugegeben. Die Reaktionsgemische wurden zur Bindung der Polymerase an die DNS 20 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe der optimierten Menge an Exonuklease ließ man die Reaktion 10 min ablaufen. Die Nuklease-

reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 M Ammoniumacetat, 50 mM EDTA und 10 µg/ml Kalbsthymus-DNS beendet. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) und nach Ethanol-fällung wurden die durch die Exonukleasebehandlung entstehenden DNS-Fragmente auf 6 % Harnstoff-Polyacrylamid Sequenzgelen analysiert.

V. Versuche zur in vitro Prozessierung von Introns aus tRNS-Genen von Thermoproteus

3 g (Naßgewicht) Thermoproteus-Zellen wurden in 7 ml Aufbruchpuffer (50 mM Tris/Acetat pH 7.5, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 50 % Glycerin) resuspendiert und durch drei Passagen durch eine French-Pressure-Zelle (American Instruments Company) bei 124,2 MPa aufgebrochen. Durch Zentrifugation bei 30.000 x g für 30 min und 100.000 x g für 1 h wurden der S30-beziehungsweise der S100-Extrakt erhalten. Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) ergab eine Proteinkonzentration von 1,1 mg/ml.

Ein typischer in vitro Prozessierungsansatz enthielt folgende Komponenten:

50 mM	Tris/Cl pH 8.0
5 mM	$MgCl_2$
1 mM	ATP
4 %	Glycerin
2 µl - 10 µl	S100 Rohextrakt

und etwa 50.000 cpm in vitro transkribierter tRNS in 50 µl Reaktionsvolumen. Inkubiert wurde 20 min bei 80°C. Die Reaktionsprodukte wurden nach Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung auf Harnstoff-Acrylamidgelen analysiert.

VI. Analyse eines Thermoproteus-Restriktionsenzym

Die Extraktbereitung erfolgte wie in Kapitel V angegeben. Der Standardrestriktionsansatz war 50 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 μg bis 1 μg markiertes DNS-Fragment, 3 μl S100 Rohextrakt in 50 μl . Dieses Gemisch wurde 1 h bei 80°C inkubiert. Die durch Einwirkung der Restriktionsnuklease entstandenen DNS-Fragmente wurden auf Harnstoff-Acrylamidgelen analysiert.

VII. Besondere Chemikalien und deren Bezugsquellen

Enzyme für die in vitro Reaktionen mit Nukleinsäuren (Restriktionsendonukleasen, Ligase, Polynukleotidkinase etc.) wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Pharmacia P-L Biochemicals (Uppsala) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die SP6-Polymerase und die Reverse Transkriptase aus Avian Myeloblastosis Virus stammten von Boehringer Mannheim GmbH, die Vaccinia Virus Guanylyltransferase von GIBCO BRL GmbH (Eggenstein).

Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "reinst" oder "p.A." und wurden von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) erhalten.

Radioaktive Verbindungen wurden von New England Nuclear (Dreieich) oder Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert.

C. ERGEBNISSE

I. tRNS-Gene und ihre Organisation in *Methanococcus*

1. Subklonierung und Restriktionskartierung von tRNS-Klonen aus *Methanococcus vannielii*

In einer vorausgegangenen Arbeit (Wich, 1984) waren eine Reihe von DNS-Fragmenten des *M. vannielii* Genoms, die mit Gesamt-tRNS aus diesem Organismus hybridisierten, in den Plasmidvektor pUR2 kloniert worden. 68 positive Klone konnten durch Restriktionsanalysen in neun Gruppen mit gleichen Inserts aufgeteilt werden. Durch Hybridisierungen gelelektrophoretisch aufgetrennter Insert-DNS-Fragmente mit radioaktiv markierter tRNS konnten die Bereiche, in denen nach tRNS-Genen zu suchen war, weiter begrenzt werden (siehe Abb. 2). Vier solcher hybridisierender Subfragmente mit einer Größe, die sie für eine Sequenzermittlung leicht zugänglich erscheinen ließ, wurden für die Weiterarbeit ausgewählt.

Die hybridisierenden Bereiche wurden in geeignete Plasmidvektoren subkloniert. Das hybridisierende 1,62 kb EcoRI/ClaI-Fragment aus pMV1/1 und das hybridisierende 1,48 kb EcoRI/ClaI-Fragment aus pMV2/2 wurden in den entsprechend geschnittenen Vektor pBR328 insertieren, und rekombinante Klone wurden durch die Inaktivierung der Chloramphenicolresistenz nachgewiesen. Das hybridisierende 0,55 kb ClaI-Fragment aus pMV2/1 und das 0,75 kb ClaI-Fragment aus pMV3/1 wurden in den Vektor pBR322 unter Inaktivierung der Tetracyclinresistenz subkloniert. Für die rekombinanten Plasmide wurde nachgewiesen, daß sie Inserts der richtigen Größe besitzen und noch mit *Methanococcus* Gesamt-tRNS hybridisieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

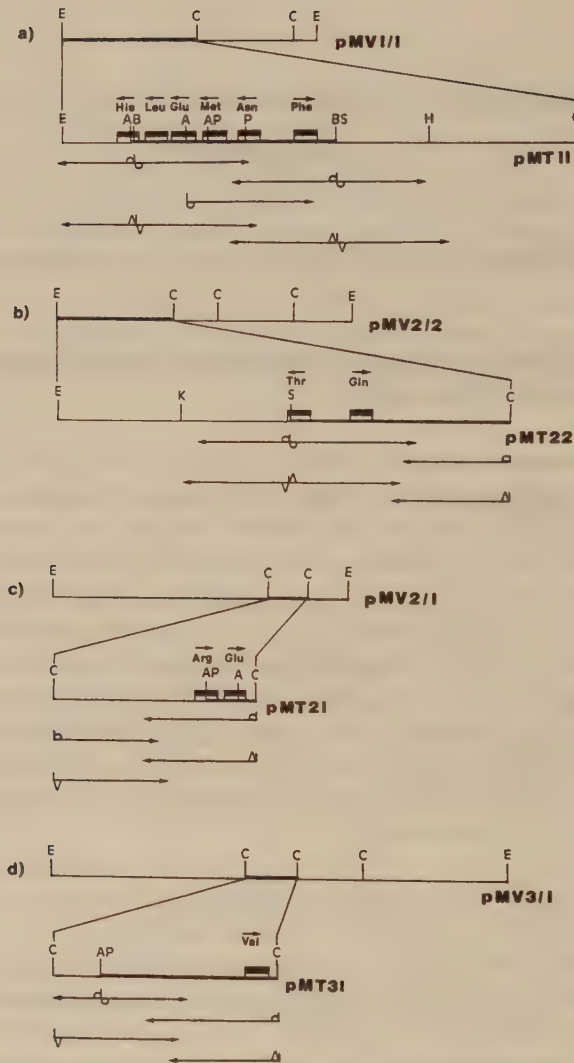


Abb. 2: Restriktionskarten der klonierten tRNA-Gene aus *M. vanthielii* und ihre Sequenzstrategie: Diejenigen Fragmente der Plasmide, die mit tRNA hybridisieren (verstärkte Linien) und die für die Sequenzanalyse subklontiert wurden, sind vergrößert dargestellt. Regionen, die für tRNA kodieren, sind durch Balken gekennzeichnet. Die Aminosäurespezifität und die Transkriptionsrichtung sind über den tRNA-Genen angegeben. Pfeile unterhalb der DNS-Fragmente zeigen den Ausgangspunkt und Umfang der einzelnen Sequenzanalysen; 5' markierte Fragmente sind durch Halbkreise, 3' markierte Fragmente durch Dreiecke gekennzeichnet. **Abkürzungen der Restriktionsschnittstellen:** A (AvaI), AP (ApaI), B (BamHI), BS (BstEII), C (ClaI), E (EcoRI), H (HindIII), K (KpnI), P (PstI).

Von jedem der Subklone wurde eine detaillierte Restriktionskarte angelegt, um Ansatzpunkte für die bei der chemischen Sequenziermethode (Maxam und Gilbert, 1980) notwendige Endmarkierung der zu sequenzierenden DNS-Fragmente zu erhalten. Die tRNS-kodierenden Bereiche wurden durch weitere Hybridisierungen auf möglichst kleine DNS-Bereiche der klonierten Fragmente eingeengt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefaßt.

2. Bestimmung der Nukleotidsequenz der klonierten DNS-Fragmente

Um Lage, Art und Anzahl der auf den hybridisierenden DNS-Bereichen lokalisierten tRNS-Gene zu analysieren, wurde die DNS-Sequenz dieser Regionen erstellt. Die Sequenzierstrategie zu den einzelnen klonierten DNS-Fragmenten ist in Abbildung 2 dargestellt. Alle Sequenzen dieser Analyse wurden durch 5' und 3' Markierung der Restriktionsfragmente unabhängig für beide DNS-Stränge bestimmt. Insgesamt wurden 3.439 bp des *M. vanielii* Genoms bestimmt. Diese Sequenzen und ihre Zuordnung zu den verschiedenen Klonen zeigt Abbildung 3 a-d.

- siehe nachfolgend Abbildung 3 a-d -

a)

10 20 30 40 50 60 70 80
 TAAGAAATGGTACGAACCTTGAAAGCAATGGGAGCGGTAAAGCTTGACATATTGCCCCATTTTCTTCGTGGAATTTGGCTGG
 ATTTGTTACCAATGCTTGAACCTTTGTTAAACCTGCGCATTCGAACCTGTATAACGGGATAAAGAGGCAACCTTTAACCGACC

90 100 110 120 130 140 150 160
 TTTGCAATATATAGATCGAATTTATATGTTCCAAATAGCTGTTCACCGTCGAAAGACCTTACATTTCTGGCTATTCTTTTAA
 AAGCTATATATGTAGCTTAAATATAGAAATTTATCGAGAAAGTGGGAGCTTTGTGAATGTAAGACCCGATAGAAGAAATTT

170 180 190 200 210 220 230 240
 ATAGTTTTTTATAGCTAATATCTGTTTTTTTCCGTAGCTTTACCCATCTGCGSATAACTTTCATAATTCACCATTTTGA
 TATCAAAAAGATCGTGTATATAGACAAAAAGGCGATCGAAATGGGTATGACGGCTATTGAAAGTATTAAAGTGGTAAAGCT

250 260 270 280 290 300 310 320
 CGAATAATTTAAAGTACGCGCTTATATTATTAATTAATAGCTATATAAATAGCTATTAAAGAAAGTAAGATATATTAGTAAAT
 CGTATTAAGAAATTCGATCGCAATATATAAATATTATATATATTTATGTAATTTTTCATTCTATATATAATCATTTTA

330 340 350 360 370 380 390 400
 ATTCGTAAGAAAGCTTTACGCTAAGTGGTACCCTAATAAATATATATTTAAATTTATAAATTAATTTGCCCTAAATGAA
 TACCGCTTTTGAAGAAATTCATTCACCAATGGATTTTATTATATAAATTTAGATTTTAAITAAACGGGATTTCATT

410 420 430 440 450 460 470 480
 AAAGTTGCCAAAGGGGATTCGAAACCGCGACACTGCGATCTTCAGTCCAGCGTCTCCAGGTCGAAGTACCTTGGCT
 TTTGACGGTTCGCCCACTAAGCTTTGTCGCTGTTGACCTAGAAGTCAGGTCGCAAGAGGGTCCAGCTTGATGGAACCGA

490 500 510 520 530 540 550 560
 ATCTTTAATTAAGTACAGATTAAGCATATCTTTCTTAGTATATATATTTTGTAAAGAGGTTTATATAGTAGAATGTT
 TAGAAATTAATTTAGGTGTTAATTCGTATAGAAAGAAATCATATATATATAAAGCAATTTTCCAAATATATCATCTTACAA

570 580 590 600 610 620 630 640
 AATTTATATTTGCGGTCAGATAGTAAGACAGCGAGGCTTCCTAGCTTCAGTAGGTAGCAGCGATGGACTTTAATCCGATA
 TTAGCAATTAAGACCGCGAGTTTCATGATTCGTGCTGCGGAGGATTCGAGTACCTCCCTGCTACCTGACAATTAGGTAT

650 660 670 680 690 700 710 720
 GATTCGAGGTTTGAGCGCTTCGAGGAGGCGCATTTTCTAAACATTTAAACAGATTAACTCGAGTGTGGGCTCGTAGCT
 CGAGCTCGAAGCTCGGAGCTTCGCGGTAAGAAAGATTTGTAATTTGGCTTAATTAGCTCAACACCGGAGCATCGA

730 740 750 760 770 780 790 800
 CAGGCTGATTAAGTGTTCGCGTCAATACCGAGTGTGATGGTTCAATCCCATCGGCCCCATACAAATGAATGAAAGT
 CTCGAGCGCAATTCACCGAGCGGAGTATGAGCTCAGGATACCGAAGTTTAGGGTAGCCCGGGTATGTTACTTACTTTTCA

810 820 830 840 850 860 870 880
 TAAAGTTGATCGGCTGGTGTAGTCCGCGCAATCATGCTGGCTTTTCGAGCCAGCGGACTCGGGTTCAATCCCGCGCGAG
 ATTGAGTGAAGCGCAACCGATCAGGCGGATAGTACGAGCGGAAAGCTGGTCTGCTGAGCCCAAGTTTAGGCGCGGCTC

890 900 910 920 930 940 950 960
 CATTTATTTTAAAGTCAGGCGGTTGTCGAGCTTCGCGCAAGATGCGAGGCTTAGAATCTGTCCAGTAGTGGTCCAGG
 GTAAGAAATGAATTCAGTTCGCCAAGAGCTCGGAGCTGCTTCAGCTCTGAATCTTAGGACAGGTCATCACCAGGCTC

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 GTTCAAAATCTTCGCGCTGCTTATATATTAAGCGGCGAGATACCGCAAAATATAATACCTTCACATCTGTGGCCGAGGT
 CAGGTTTAGGCGAGCGGAGCTGATATATATATGCGCGCTATGGGTGTTTATATATGGAAGTGTAGACACCGGCTCCA

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGTAATGATCTTCGAGGAGCTGTCGAGCTTCGAGCGGCTCAATTCGCGCTTCGCGCGGCTTTTATATATGGG
 TCCGATTCAGGATAGGAGTTCCGAGACCTAGGAGCTGCGCGGAGTTAGGCGCGAGGCGGCGGTAAGAAATATAACCGG

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATATTAATTTTATTAATTAAGTCAATTAATATATATATAGTAATAGTTATAGTAATTAGGCAATATATTCGATTGATTATT
 TATAATTAATTAATTAATTTAGTTATTTATATATAATCATATCAATATCATTAACTCCGTATATAAGCTAACTAATAAA

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 TTGACATATATTTTAAATTAATTAAGCAAGCTATTTTCTAAAGAGACATCAATTAAGAAATATTTTAGCATATT
 AACTTGTATTAAGAAATTAATTAATTTGTTGATTAAGAAAGATTTTCTGTTAGTTAAATTTTTTAATAAATCGTATAA

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 TAATTAAGTATTAATTAATTAAGCAATTAATTAAGCATATTTAATTTAGCATATTTAATTTAGCATATTTTAAAGACGG
 ATTAAGTGTATATTAATTAATTAAGTGTATTAATTAATCGTATAAATTAATCGTATAAATTAATCGTATAAATTTTGGC

b)

```

10      20      30      40      50      60      70      80
ACTCGAAAGACGATATAAGAAAAAAATTTACGAATAATACATAATGAAAAGTCGCTAGAACTGGATGAAAAAGT
TGAGCTTTTCTGCTATATCTTTTTTTTAAATGCTTTATTATGTATTATACCTTTTCAGCAGATCTTGACCTACTTTTTCA

90      100     110     120     130     140     150     160
TATGGATGATGATATACGGCTTCTTAGAACCATTTGGTTCACTTCACGGATATACCTGAACTTATGGTCAAGGAAATTCGAT
ATACCTACTACTATATGCGCGAAGAACTTTGGTAACCAAGTGAAGTGCCCTATATGACCTGAATACCAAGTTCCTTTAAGCTA

170     180     190     200     210     220     230     240
ATGATTCACTAAAAACGGACAGTTTGACCTTTAAATCATGCGCTTTTTTCAAATTCCTATAAAAAAGBATACTCTGTA
TACTAAGTGATTTTTTGCTGTCAAACCTGGGAAATTTAGTACGGCAAAAAAGTTTTAAGGTATTTTTTCTATGAGACAT

250     260     270     280     290     300     310     320
AAAATAAATCAGGAAGTGTCCAATTACCTTAAAGGGGAAATATTCGATCATGAAAGTAAAGAAATTCCTGCAAGCTA
TTTTATTAGTCTCTTACAAGGTTAATTGGAATTTCCCTTTTATAAGCTAGTACTTTCATTTCTTTAAGBAGGTTTCGAT

330     340     350     360     370     380     390     400
TCTTTTATTCTGTTTGGGCGATGATTGATTTGAAATCTTTTAAATCTTTTTATTTTTTTATAGCTTACTTTAAGGAT
AGAAAATAAGAACAAACCCGTACCATACTAAACCTTTAAGAAATTTAGAAAAATAAAAAAATATCGAATGAATTCCTA

410     420     430     440     450     460     470     480
TTGAGTATAAAATAGATTTAAATTAATATATTTAGATTAAATAATTAATTTATCCAAATTAAGAAATAGCCGAGCGGG
AACTCATATTTTATCTAAATTTAATTATATAAACTAATTATTAAATGAAATGTTTTAATTTTTCATCGGGTCGCGCC

490     500     510     520     530     540     550     560
ATTGGAACCGGGTCCAGGTTCCAAGACCTAGATGATTGGCCACTACACTACTGGGCTTCAGTGAGTTGCATTAAATTA
TAAGCTTGGCGCCAGGGTCCAAGGTTCTGGATCTACTAACCGGTGATGTGATGACCGAAGTCACTGAACGTAATTAAT

570     580     590     600     610     620     630     640
GATTGAAATTATATTATATAAAGTTTCGGTAAATGCGGTTTTAGTATTGGTAATCACCGAAAACCTTTATATACTGTTTA
CTAAGCTTAATATAATATATTTCAAAGGCCATTACGCCAAAATCATAACCATTAGTGGCTTTTGAATATATAGACAAT

650     660     670     680     690     700     710     720
TTATGTATTTCAATTTGGAAGTTGTTTATATTTTTGAGCTCAGTGGCTCAGCCTGGTAGAGCGCTGCTTGGTAAGCAGG
AATACATAAAGTAAGCTTCAACAAATATAAAACCTCGGAGTCACCGAGTCGGACCATCTCGCGGACCAACCATTCGTC

730     740     750     760     770     780     790     800
AGGCCGCGGGTTCAACCCCGCTGAGGCTCGTTTTTAAATTTACAAATATATATTTAAAAATTTAGATATATAAAATAT
TCCGGCGCCCAAGTTGGGCGGACTCCGAGCAAAAATTAAGTGTATATATAAATTTTTAAATCTATATATTTTATA

810     820     830     840     850     860     870     880
ATATGTAGTTATTATCAAAATTTATAAAATTTATAAAATTTATAAAATCAGTATTAAACCCACTTAGCTAAAAAGTC
TATACATCAATAAAGTTTAAATATTTTAAATATTTTAAATATTTTAGTCATAATTTGGGTATGAATCGATTTTTCAG

890     900     910     920     930     940     950     960
CTTATCTTCTGATTTAAATCATATTTTTTAGTTGGGGGAATTGAAGAGGCTGTTTTAGCATAAATTTTCCACCTTTCT
GAATGAAGGACTAAATTTAGTATAAAAAATCAACCCCTTAAGCTCTCGACAAAATCGTATTTAAAAAGGTGGAAGA

970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
TTTTTGACCTAATAAAGCTTCCAGCATTTCCATTTATAATTATTTTCCAAAACCATTCGGAAGCAGTAAATCTGACC
AAAAACGTGGATTTTGAAGAGTGTAAAGGTAATATTAATATAAAGTTTTGGTATAGGCTTCGTCATTTTGAAGCGG

```

Abb. 3 a-d: Sequenzen der DNS-Fragmente aus pMT11 (a), pMT22 (b), pMT21 (c) und pMT31 (d), die mit tRNS aus *Methanococcus vannielii* hybridisieren: Regionen, die für tRNS-Gene kodieren, sind umrandet. Mögliche offene Leserahmen, eine putative Promotor- (P) und eine putative Terminatorstruktur (T) sind durch Linien über der Sequenz gekennzeichnet.

c)

10	20	30	40	50	60	70	80
GTACTGATTTTATTAACCTCCTGAAATTTGGAACGSTATTTTGTAGTTTCAATTGAAGAAATAACGCGAGGAAATAACCCCTTT							
CATGACTAAATAATTGAGGACTTTAACTTGCATAAAACATCAAAGTTAACTTCTTTATTGCGCTCTTTATTGEGGAA							
90	100	110	120	130	140	150	160
GTTTTTTTAAAGTTTTCTAAAAATCCGTTTTTCATTAAATAGATATAACTGGCATTTTTTCTACTTAGCTTCTAATTTTCACT							
CAAAAAAATTCAAAAAGATTTTTTAGGCAAAAGTAATTATCTATATTGACCGTAAAAAAGTGAATCGAAGATTAAAAGTGA							
<u>T</u> 170 180 190 200 210 220 230 240							
TTTAATTTTAAATTAATTTTATTAGTTTTTAATTAATCTTTATTTCCAATATATTTTAAATCATGCTCATATTTTATGTC							
AAATTAAAAATTAATTATAAATAATCAAATTAATTAGAAATAAGBTATATAAAATTTAGTACGGAGTATAAATACAG							
250	260	270	280	290	300	310	320
TTTAGTCGTCATACCTTTACCTTGTTTTTCGATTATATTTTATCATTGTGCTTTAAATAGTATTTTAAAAAATTCGTTTTAA							
AAATCAGCATATGAAATGGAACAAAAGCTAATATAAAATAGTAACACGAAATTTTATCATAAAATTTTTTAAGCAAATTT							
330	340	350	360	370	380	390	400
ACTTATTTGAAATATATTAATTTTAAATACCGAAATATTTATATACATAGAATACCTTCTCTATACATGCTCTTGAA							
TGAATAAACTTATATAAATTATAAAAAATTATGCGCTTTATAAATATATGATCTTATGGGAAGGATATGATACGAGAAGCTTT							
410	420	430	440	450	460	470	480
CACAATGTAGAGACGGGGGCCCGTGGCTAGTCTGGATACGGCACCAGGCTTCTAAGCCGGGGATCGGGGGTTCAAATCC							
GTGTTACATCTCTGCCCGCGGGCACCAGGATCAGACCTATGCCGTGGCCGGGAAGATTCGGCCCCAGCCCCCAAGTTTAGG							
490	500	510	520	530	540	550	560
CTCCGGGTCCTTTTAAATAAATTTCAAGGTAAATGCTCCGGTGGTGTAGTCCGGCCAATCATGCTGGCCTTTCGAGCCAG							
GAGGCCAGGCAAAATTTTAAAGTTCCATTTACGAGGCCACCACATCAGGCCGGTTAGTACGACCGGAAAGCTCGGTC							
570	580	590	600	610	620	630	640
CBACTCGGGTTCAAATCCGGCCGGAGCACTTTTTTAATTTTGAAGATATTAATCGATGATAAGCTGTCAACATGAGAA							
GCTGAGCCCCAAGTTTAGGGCCGGCTCGTGAAAAATTTAAATCTTTATAATTAGCTACTATTCCAGAGTTTGTACTCTT							

d)

10	20	30	40	50	60	70	80
CTATTTTTTCAGTATTTTTTCTCTTTTATATTATTAATAATTTTTTGAACGCTCTAAATATTTTTTGAACGCTTAGAA							
GATAAAAAAGTCATAAAAAAGAGGAAATATAATAATTATTAATAAACTTGCAGATTTTATAAAAACTTGCAGATCTT							
90	100	110	120	130	140	150	160
TCTTCTATAATTTTTTCGGTCTATAAGGAACTTTCAATCATCATGTCTCCTATATTATAGCATGTTTTATTATGCA							
AGAGATATTATATAAAAAAGCAGATATTCCTTGAAAGTTAGTAGTACAGAGGATATAATATCGTACAAAATAAATACGT							
170	180	190	200	210	220	230	240
TTTTTCATATACGGTATGCACCGAAAAGTTTATATATCATGAATCTATGTTTAGTTTGCTCTCAGTAGGGAGTTAATGT							
AAAAAGTATATGCCATACGTGGCTTTTCAAATATATAGTACTTATGATACAAATCAAACGAGAGTCATCCCTCAATTACA							
250	260	270	280	290	300	310	320
AAGCAAATAGGACTCATGTTCTAGTTGGCTATGACATCGCCCTTACAAGGCGAGGGTCGCCGGTTTGAATCCGGCTGGGT							
TTCGTTTATCTGAGTACCAGATCAACCGATACTGTAGCGGGAATGTTCCGCTCCAGCGGCCAAGCTTAGGCCBAGCCCA							
330	340	350	360	370	380	390	400
<u>T</u> CCACATTTTTTAAATTTTGAAGCATATGATC							
GGTGATAAAATTAAGCTGTATACATAG							

3. Identifizierung von tRNS-Genen innerhalb der sequenzierten Bereiche

tRNS-Moleküle zeichnen sich neben der strikt konservierten Sekundärstruktur durch eine Reihe stark konservierter Primärsequenzbereiche aus (siehe Sprinzl et al., 1985 a,b). Es ist deshalb relativ leicht möglich, in einer Sequenz diejenigen Bereiche, die für tRNS kodieren, zu bestimmen. Die computer-gestützte Analyse der Sequenzen aus *Methanococcus* (Abb. 3 a-d) zeigte die Anwesenheit von 11 tRNS-Genen in den vier Klonen. Gemäß ihrer Anticodonsequenz besitzen die kodierten tRNS-Arten folgende Aminosäurespezifitäten:

pMT11: tRNS^{Phe} (GAA), tRNS^{Asn} (GUU), tRNS^{Met} (CAU),
tRNS^{Glu} (UUC), tRNS^{Leu} (UAG) und tRNS^{His} (GUG)
pMT22: tRNS^{Gln} (UUG) und tRNS^{Thr} (GGU)
pMT21: tRNS^{Arg} (UCU) und tRNS^{Glu} (UUC)
pMT31: tRNS^{Val} (UAC)

Die tRNS^{Glu}-Gene in pMT11 und pMT21 besitzen identische Nukleotidsequenz.

In drei der vier tRNS-Klone, nämlich in pMT11, pMT21 und pMT22, liegen tRNS-Gene eng geclustert vor. Es ist interessant, daß das Gen für die tRNS^{Phe} in pMT11 in unterschiedlicher Richtung zu den restlichen fünf tRNS-Genen dieses Clusters transkribiert wird. Genauso sind die beiden tRNS-Gene in pMT22 eng benachbart, zeigen aber unterschiedliche Orientierung und sind somit auf unterschiedlichen DNS-Strängen kodiert (Abb. 2 und 3 a,b). Die entsprechenden intercistronischen Bereiche, in denen jeweils zwei Transkriptionsstartstellen liegen müssen, sind nur 115 Basenpaare (pMT11) und 146 Basenpaare (pMT22) groß. Eine solche Clusterung von tRNS-Genen mit entgegengesetzter transkriptioneller Orientierung ist häufig bei mitochondrialen, plastidären und eukaryontischen chromosomalen tRNS-Genen, wurde jedoch bis jetzt noch nicht für Prokaryonten beschrieben

(Hovemann et al., 1980; Anderson et al., 1981; Rosen et al., 1984; Orosco et al., 1982; Makowski et al., 1983).

Fünf der sechs tRNA-Gene in pMT11 und die beiden tRNA-Gene in pMT21 weisen identische transkriptionelle Orientierung auf. Dies und die Tatsache, daß sie jeweils nur durch sehr kurze intercalstronische Bereiche (14 bis 50 Basenpaare) voneinander getrennt sind, legen die Vermutung nahe, daß sie in Operonstrukturen zusammengefaßt sind. Eine Cotranskription konnte für die beiden tRNA-Gene in pMT21 durch S1-Kartierungen bewiesen werden (siehe Kap. III.1). Eine vergleichbare transkriptionelle Einheit wurde vor kurzem für ein 5S rRNA-Gen und sieben tRNA-Gene in *M. vannielii* beschrieben (Wich et al., 1984).

Abbildung 4 zeigt die zehn verschiedenen, auf den klonierten tRNA-Fragmenten kodierten tRNA-Spezies in der charakteristischen Kleeblattstruktur. Alle Sekundär- und alle Primärstrukturelemente stehen in Übereinstimmung mit den Konsenseigenschaften, die aus den bislang beschriebenen tRNA-Sequenzen abgeleitet worden sind (siehe Sprinzl et al., 1985a,b).

Aufgrund ihres Anticodons (CAU) wurde eines der tRNA-Gene von pMT11 als spezifisch für die Aminosäure Methionin beschrieben. Die Ähnlichkeit zu den tRNA^{Met}-Sequenzen aus *Halobacterium volcanii* (Gupta, 1984), zu den Met-Initiator-tRNA-Sequenzen aus *Thermococcus*, *Sulfolobus*, *Halococcus* oder *Thermoproteus* (Kuchino et al., 1982; Wich, diese Arbeit) und zu tRNA^{Met}-Sequenzen aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Sprinzl et al., 1985 a,b) ist jedoch sehr gering. Im Gegensatz dazu besteht die sehr hohe Homologie von 92 % zu einer tRNA^{Ile}-Spezies (CAU) von *H. volcanii* (Gupta, 1984). Dies legt die Vermutung nahe, daß diese tRNA in Wirklichkeit spezifisch für Isoleucin ist. Es wurde bereits für eine Reihe von tRNA mit dem Anticodon CAU beschrieben, daß eine Modifikation an der "Wobble"-Position zu einer Erkennung des AUA-Codons für Isoleucin führt (Green und Vold, 1983; Kashdan und Dudoock, 1982; Fukada und Abelson, 1980; Kuchino et al., 1980).

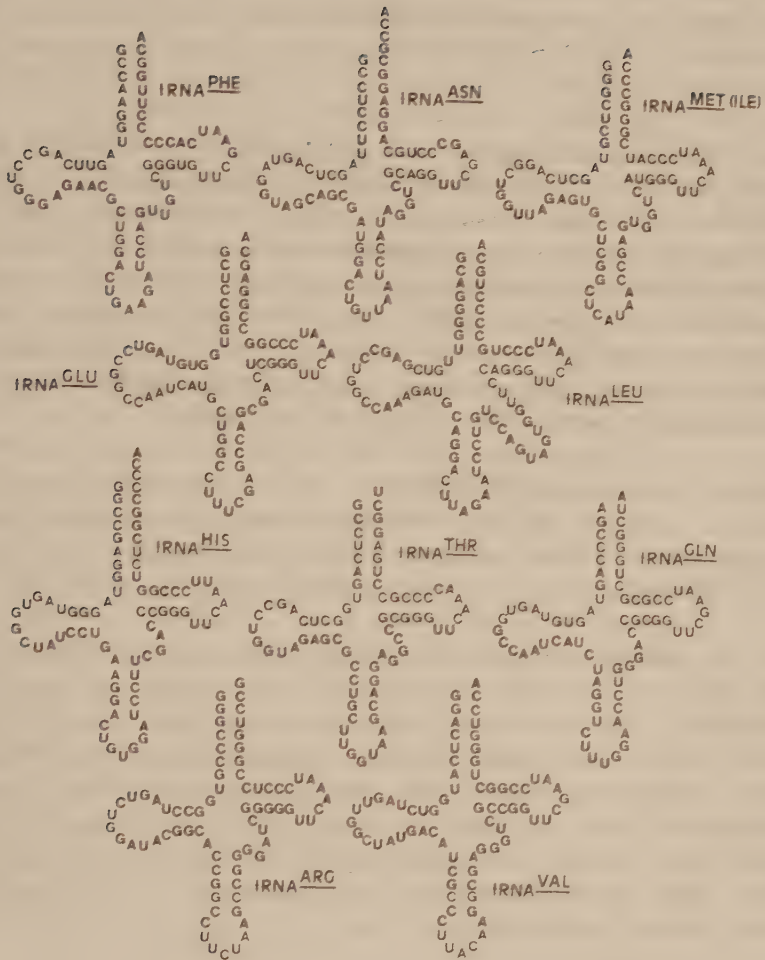


Abb. 4: Kleeblattstrukturen der tRNA aus *M. vanielii*: Die angegebenen Aminosäurespezifitäten sind aus der Anticodonsequenz abgeleitet.

Die tRNA^{His}, die durch pMT11 kodiert wird, teilt mit tRNA^{His}-Sequenzen aus Eukaryonten und Eubakterien die Eigenheit, daß der gepaarte Bereich des Aminoacylarmes um eine Base verlängert ist.

Die tRNA^{Phe} (GAA) Sequenz aus pMT11 weicht in einem Primärstrukturelement von eubakteriellen und eukaryontischen Sequenzen ab. Alle bis jetzt beschriebenen tRNA^{Phe}-Sequenzen aus Eubakterien besitzen die konservierten Nukleotide A₂₀ und U₄₅, während eukaryontische Sequenzen hier die Nukleotide G₂₀ und G₄₅ enthalten. Wie die tRNA^{Phe} aus *H. volcanii* (Gupta, 1984), nimmt die tRNA^{Phe} aus *M. vannielii* hier eine intermediäre Stellung ein, indem sie G₂₀ und U₄₅ besitzt (für die Numerierung der tRNA-Basen siehe Sprinzl et al., 1985a).

Keines der sequenzierten tRNA-Gene aus *M. vannielii* enthält ein Intron, wie es für andere Archaeobakterien beschrieben wurde (Kaine et al., 1983; Daniels et al., 1985; Kaine, 1987; Wich, diese Arbeit).

Das für tRNA-Moleküle universelle 3' terminale CCA-Ende ist nur bei zwei der elf hier beschriebenen tRNA-Genen auf DNS-Ebene vorhanden. Zwei weitere tRNA-Gene aus *Methanococcus* sind beschrieben, die das 3' CCA-Ende besitzen (Wich et al., 1984; Wich, diese Arbeit). Allen anderen tRNA-Genen aus Archaeobakterien, die bis jetzt veröffentlicht wurden, fehlt diese Sequenz (Kaine et al., 1983; Daniels et al., 1985; Jarsch und Böck, 1983; Hui und Dennis, 1985; Lechner et al., 1985; Daniels et al., 1986; Kaine, 1987).

II. Sequenzierung eines 5S rRNS/tRNS Gen-Clusters aus *Methanococcus voltae*

Wie vor kurzem veröffentlicht, besitzt *M. vannielii* neben vier 16S-23S-5S rRNS-Operonen zusätzlich ein "extra" 5S rRNS-Gen, das mit sieben tRNS-Genen in einer Transkriptionseinheit zusammengefaßt ist (Jarsch et al., 1983; Wich et al., 1984). Ein solcher Organisationstyp ist bis jetzt nur für Archaeobakterien beschrieben worden. Bemerkenswerterweise weicht die Nukleotidsequenz des "extra" 5S rRNS-Gens in *M. vannielii* von derjenigen der Gene aus den rRNS-Transkriptionseinheiten in 13 Positionen ab (Wich et al., 1984; Jarsch und Böck, 1985). Ein solch hoher Sequenzpolymorphismus in einem einzigen Genom kann nun einerseits durch unabhängige Evolution der beiden Gentypen nach einer initialen Genduplikation oder andererseits durch einen lateralen Gentransfer, z.B. des "extra" 5S rRNS-Gens, hervorgerufen werden. Um dieser interessanten Frage nachzugehen, wurde die Organisation und die Primärstruktur der 5S rRNS-Gene aus dem nahe verwandten Archaeobakterium *M. voltae* analysiert.

1. Organisation der rRNS-Gene in *Methanococcus voltae*

Um die Anzahl und Organisation der 5S rRNS-Gene in *M. voltae* zu bestimmen, wurde chromosomale DNS aus diesem Organismus mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII vollständig geschnitten. Die erhaltenen Fragmente wurden auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und gegen radioaktiv markierte 5S rRNS aus *Methanococcus* hybridisiert. Für jedes Restriktionsenzym findet man zwei DNS-Fragmente, die reagieren (Abb. 5). Im Falle von EcoRI ist dies ein 11 kb und ein 8,5 kb, im Falle von HindIII ein 4,2 kb und ein 2,65 kb Fragment. Wie Abbildung 5 zeigt, sind die Hybridisierungssignale des 4,2 kb HindIII und des 8,5 kb EcoRI Fragments deutlich stärker als die der anderen Fragmente. Weit längeres Exponieren (72 h statt 3 h wie für Abb. 5) lieferte noch eine weitere, sehr schwach hybridisierende HindIII-Bande auf Höhe von 5,2 kb (nicht gezeigt). Lionel Sibold vom Pasteur Institut (Paris) verwandte

die gereinigte 5S rRNS als Sonde, um in einer von ihm in pUC9 mit HindIII-Fragmenten angelegten Genbibliothek von *M. voltae* nach klonierten 5S rRNS-Sequenzen zu suchen. Die hybridisierenden rekombinanten Plasmide wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pS1 enthält das 4,2 kb, pS2 das 2,65 kb und pS3 das schwach hybridisierende 5,2 kb HindIII-Fragment.

Um die genomische Organisation und die Umgebung der klonierten Gene zu bestimmen, wurden die rekombinanten Plasmide mit gereinigter 16S, 23S rRNS (von Frau Dr. H. Hummel erhalten) und mit gereinigter 5S rRNS und tRNS hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen zeigt Abbildung 6.

Das 2,65 kb Fragment aus pS2 und das 5,2 kb Fragment aus pS3 hybridisieren mit 23S rRNS, das Fragment aus pS3 zusätzlich mit 16S rRNS und tRNS. Im Gegensatz zu pS2 kann mit dem Insert aus pS3 jedoch keine 5S rRNS-Hybridisierungsaktivität gefunden werden. Das schwache Signal, das oben erwähnt wurde, beruht vermutlich auf einer leichten Verunreinigung der als Sonde verwendeten 5S rRNS mit tRNS. Das 4,2 kb HindIII-Fragment aus pS2 hybridisiert nur mit Gesamt-tRNS und 5S rRNS aus *Methanococcus*.

Die wahrscheinliche Organisation der rRNS-Gene aus *M. voltae*, die sich aus diesen Daten ableitet, ist in Abbildung 7 gezeigt. *M. voltae* besitzt demnach ein rRNS-Operon, das 16S, 23S und 5S rRNS in sich vereinigt. Dieses Operon wird durch eine HindIII-Schnittstelle innerhalb der 23S rRNS-Sequenz in zwei Stücke geteilt. Die HindIII-Schnittstelle ist in der 23S rRNS des nahe verwandten *M. vannielii* konserviert (Jarsch und Böck, 1985). Die beiden Fragmente sind in pS2 (5S rRNS-Gen und 3' Anteil der 23S rRNS) und pS3 (5' Anteil der 23S rRNS und 16S rRNS-Gene) kloniert. Ein tRNS-Gen ist vermutlich zwischen 16S und 23S rRNS-Gen auf pS3 lokalisiert. Zusätzlich zu diesem rRNS-Operon enthält *M. voltae* ein einzeln liegendes 5S rRNS-Cistron. Die hier postulierte Organisation der rRNS-Gene in *M. voltae* konnte inzwischen durch weitere Hybridisierungen chromosomaler DNS des Organismus erhärtet werden (Dr. H. Hummel, pers. Mitteilung).

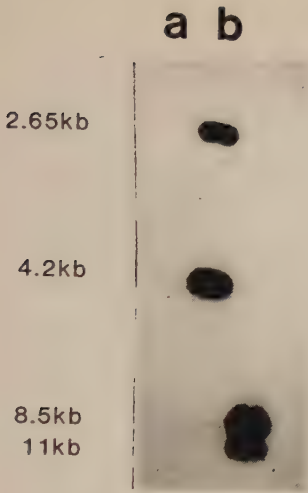


Abb. 5: Hybridisierung chromosomaler DNS aus *M. voltae* mit 5S rRNS dieses Organismus:

- a) Chromosomale DNS mit HindIII geschnitten
- b) Chromosomale DNS mit EcoRI geschnitten

Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind neben dem Autoradiogramm angegeben.

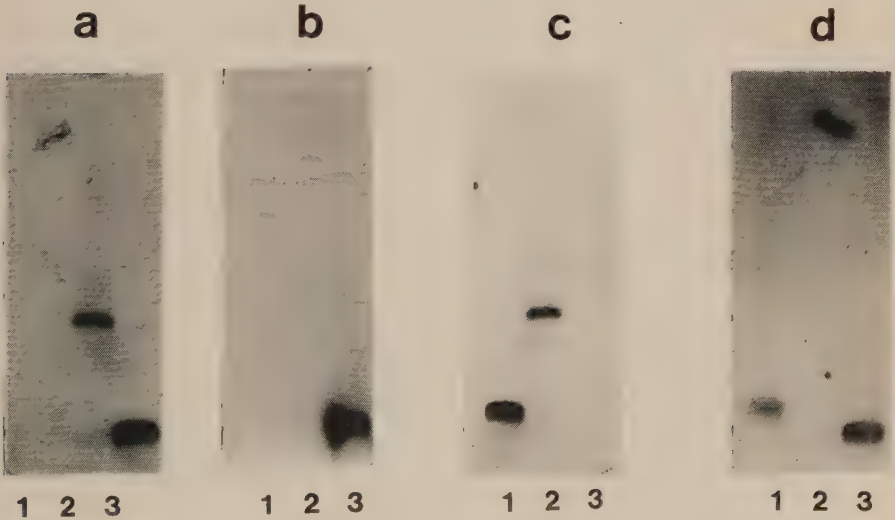


Abb. 6: Hybridisierung der rekombinanten Klone aus *M. voltae* gegen 23S rRNS (a), 16S rRNS (b), 5S rRNS (c) und tRNS (d) aus *Methanococcus*: Spur 1: Plasmid pS1; Spur 2: Plasmid pS2; Spur 3: Plasmid pS3.

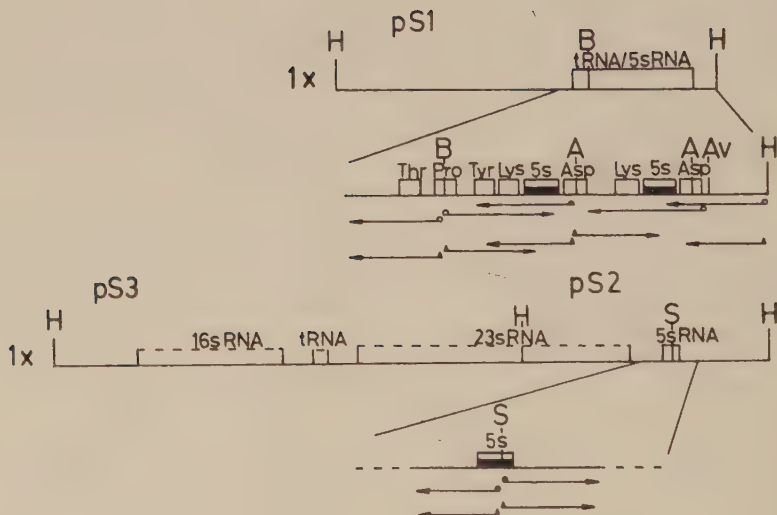


Abb. 7: Organisation der Gene ribosomaler RNS in *Methanococcus voltae*:

Diejenigen Regionen auf den HindIII-Inserts von pS1, pS2 und pS3, die für rRNS- und tRNS-Gene kodieren, sind durch Balken gekennzeichnet. Die Aminosäurespezifitäten der tRNS-Gene sind angegeben. Die unterbrochenen Linien der 16S, 23S und tRNS-Gene in pS3 und pS2 sollen zeigen, daß ihre exakte Lage auf den DNS-Fragmenten aus den in Abb. 6 dargestellten Daten nicht hervorgeht. Die sequenzierten Bereiche sind vergrößert gezeichnet: Restriktionsschnittstellen, die für die Sequenzermittlung von Bedeutung waren, sind benannt. Die Pfeile geben die Sequenzierstrategie wieder; offene Halbkreise kennzeichnen 5' markierte, offene Dreiecke 3' markierte Restriktionsstellen. Das 5S rRNS-Gen in pS2 wurde nach Subklonierung der HindIII-ScaI-Fragmente in pUC19 nach der Kettenabbruchmethode (Sanger, 1977) sequenziert (geschlossene Halbkreise).

Abkürzungen: A (AvaI), Av (AvaII), B (BamHI), H (HindIII), S (ScaI).

Diese Genorganisation in *M. voltae* hat Ähnlichkeit mit der in *M. vanniellii*: beide Organismen besitzen Transkriptionseinheiten "eubakteriellen" Typs für 16S-23S-5S rRNS und ein zusätzliches "extra" 5S rRNS-Gen. Im Gegensatz zu *M. voltae* findet man in *M. vanniellii* jedoch vier rRNS-Operonen (Jarsch et al., 1983; Wich et al., 1984).

2. Sequenzanalyse des "extra" 5S rRNS-Genbereiches

Eine Restriktionsanalyse des HindIII-Fragments aus pS1 zeigte, daß alle Restriktionsschnittstellen, die für die Sequenzermittlung eines 5S rRNS/tRNS-Operons aus *M. vanniellii* verwendet worden waren (Wich et al., 1984), in diesem *M. voltae* "extra" 5S rRNS-Cistron erhalten sind. So war eine einfache Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980) möglich. Die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 7 dargestellt. Abbildung 8 zeigt die gesamte ermittelte Sequenz des "extra" 5S rRNS-Bereiches.

Eine Analyse der ermittelten Sequenz ergab, daß sich in dieser Region eng benachbart sieben tRNS-Genstrukturen und zwei 5S rRNS-Sequenzen befinden. Die tRNS-Gene besitzen dieselbe Aminosäurespezifität wie diejenigen, die mit dem "extra" 5S rRNS Gen aus *M. vanniellii* ein Operon bilden (Wich et al., 1984): ein tRNS^{Thr} (UGU), ein tRNS^{Pro} (UGG), ein tRNS^{Tyr} (GUA), zwei tRNS^{Lys} (UUU) und zwei tRNS^{Asp} (GUC) Gene.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, ist der gesamte Sequenzblock tRNS^{Lys}-5S-rRNS-tRNS^{Asp} mit seinen flankierenden Bereichen sequenzgleich in dem tRNS-5S-rRNS-Cluster wiederholt. Um zu beweisen, daß diese Struktur tatsächlich im Genom von *M. voltae* vorliegt und nicht etwa die Folge eines Klonierungsartefakt ist, wurden Rückhybridisierungsexperimente durchgeführt (Abb. 9). *M. voltae* chromosomale DNS wurde dazu in einem Ansatz mit HindIII und in einem anderen Ansatz mit HindIII und AvaI geschnitten, und die entstandenen Fragmente wurden Seite an Seite mit den jeweiligen Fragmenten aus pS1 gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hybridisierungen wurden durchgeführt mit dem über ein Agarosegel gereinigten AvaI-Fragment aus pS1

10 20 30 40 50 60 70 80
ATATTATAAATTGTCACAAAATGCAATCATAACAATTAGTAAGTCATAATTAATTAAGTCATGTTATATCGTTGTTTAT
TATAATATTAACAGTGTTCACGTTAGTATTGTTAATCATTACAGTAAATTAATTTTCAGTACAATATAGCAACAATA

90 100 110 120 130^P 140 150 160^P
AATAATATCTAAATATATAAAATTTAATTTTATAAATGATGGAAACATTTATATAGTATAATGGTGTAGTCATTGTGC
TTATTATAGATTATATATATTTAAATTTAAATATTTACTACCTTTGTAATATATCATATTACCACAATCAGTAACACG

170 180 • 190 200 210 Thr 220 230 240
AAGTAAAAATAAAGATTCCCTCAGTGGCTCAGCCTGGTAGAGCGCTGACTTGTATACAGGTGGTCGGGGGTTGCAATCC
TTCATTTTATTTCTTAACCGAGTCCAGGATCGGACCATCTCGCGGACTGAAACATTAGTCCACGACCCCAAGCTTAGG

• 250 260 270 280 290 300 310 320
CCCCGTTGGGCTTGAGTTCCTAGGCAATAGACTTAAAGACTTTTACTTGGGCTGTGGGGTAGCCTGGTCATCCTTTGGGAT
GGGGACCCCGAATCAAGAATCCGTTATCTGAATTTCTGAAATGAACCGGACACCCCATCGGACCAAGTAGGAAACCGTA

330 Pro 340 • 350 360 370 380 390 400
TTGGGATCCTGAAACCCGATTCGAATCTGGGCAGGCCACCATTTAAATTAATACATACGAATCTGTTAGCAATAGCG
AACCCTAGGACTTTGGGGTCAAGCTTAGACCCGTCGGGTGGTAAATTAATATGTATGCTTATGACAATCGTTATCGC

410 420 430 440 • 450 460 Tyr 470 480
TATCAGAAGCATATCCAAGAATTATCCCGGATAGTTCAGACTGGTAGAACGGCGGACTGTAGATCCGATGTCTGGTGGT
ATAGTCTTCGTATAGTTCTTAATAGGGCGCTATCAAGTCTGACCATCTTGGCCGCTGACATCTAGGCGTACAGCGACCA

490 500 510 520 530 • 540 Lys 550 560
TCAATCCGGCTCGCGGACTCTTGGGCCGTAGCTTAGTCTGGTAGAGCGCTGGCTTTAAACAGGCGGTGAGGGGT
AGTTTAGGCCGAGCGCCCTGAGAAACCGGGCATCGAATCAGACCATCTCGCGGACCGAAAATTGGTCCGCCAGCTCCCAA

570 580 590 600 610 620 630 640
CGAATCCCTTCGGGCCCTTTTAGTGTGATACGGCGGTATAGCGGAGGTGTCCCATCCGATCCCATCCGATCCGATCCG
GCTTAGGGAAGCCCGGCAAAATCGACAATATGCGCCAGTATCGCTCCACAGGGTAGGCTAGGTAAGGCTAGAGCC

650 660 5S-rRNA 670 680 690 700 710 720
AAATTAAGCCCTCCAGCGATTCTTAAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTGCCGATCACTTTTATTTATT
TTAATTCGGGAGGTGCGTAAAGAATTATGACGGTATACCACCTTGTCTACTGCGACGGCTAGTCAAAAAATAATA

730 740 750 Asp 760 770 A 780 790 800
GCCCTGGTGGTGTAGCTCGGCCATCATACAGGACTGTCACTCTGTGACTCGGGTTCAAATCCCGCCAGGGGCTTTA
CGGGACCACCATCGAGCCGGATAGTATGCTCTGACAGTGAGGACACTGAGCCCAAGTTAGGGCCGTCCCGCGAAAT

810 820 830 840 850 860 870 880
TATTTAATTTGAAATATAAAATCTGCATATTAGAAATACAAATGTCATAAGCAATTAAGTACTATTTCGTAGACTT
ATAAATTAACCTTTATATTTTAGAGCTGATAATCTTATGTTTACAGTATTCGTTAATTATTCATGATAAGCAATCTGAA

890 900 910 • Lys 920 930 940 950 960
GGGCCCCGTAGCTTAGTCTGGTAGAGCGCTGCTTTTAAACAGGCGGTGAGGGTTCGAATCCCTTCGGGCCGCTTTAG
CCCGGCATCGAATCAGACCATCTCGCGGACCGAAAATTTGGTCCCGAGCTCCCAAGCTTAGGGAAGCCCGGCAAAATC

970 980 990 1000 1010 5S-rRNA 1020 1030 1040
CTGTGATACGGCGGTATAGCGGAGGTGTCCCATCCGATCCCATCCGATCTCGGAAATTAAGCCCTCCAGCGATTCT
GACAATATCGCCGAGTATCGCTCCACAGGATAGGTAGGTAAGGCTAGAGCCTTAATTCGGGAGGTTCGCTAAAGA

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
TAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTGCCGATCACTTTTATTTATTCCTCTGGTGTAGCTCGGCCATA
ATTCATGACGGTATACCACCCTTGTCTACTGCGACGGCTAGTCAAAAAATAATAAGGGACCAACATCGAGCCGGAT

1130 Asp 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
TCATACGAGCTGTCACTCTGTGACTCGGGTCAAATCCCGGCCAGGGGCTTTCTGATTTTATGGTCCAAGGACTTA
AGTATGCTCTGACAGTACGACACTGAGCCCAAGTTTAGGGCCGTCCCGCAAGACATAAAATACCAGGTTCTCGAAT

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
TTTTTATAATTTATTTTATAACTTATTTTCATTATATAAATTTTATGACAATTTATTTATGATATGACGTCATT
AAAAATATTAATAAAAAATATTGAATAAAAAGTAAATTTTAAATAAACTGTTAATAAAATAAACTACTATATGCAGTAA

Abb. 8: Sequenz des trnS/5S rRNA-Operons aus *M. voltae*: Die kodierenden Bereiche des Clusters sind umrandet. Ein putativer Promotorbereich (P) ist unterstrichen. Linien über der Sequenz kennzeichnen einen identisch wiederholten Sequenzbereich. Die Restriktionsschnittstellen eines *Ava*I-Fragments, das für Hybridisierungen verwandt wurde (s. Abb. 9), sind in der Sequenz eingezeichnet.

(siehe Abb. 7), das eine der tRNA^{Lys} -5S-rRNA- tRNA^{Asp} Einheiten enthält. In der mit HindIII geschnittenen DNS aus *M. voltae* findet sich ein hybridisierendes Fragment gleicher Größe mit dem klonierten HindIII-Fragment aus pS1. Nach gemeinsamen Abbau mit HindIII und AvaI wird dieses Fragment in hybridisierende Subfragmente geteilt, von denen eines identisch mit dem 3,5 kb HindIII-AvaI-Fragment, das andere identisch mit dem 0,38 kb AvaI-AvaI-Fragment aus pS1 ist (siehe Abb. 7 und Abb. 9).

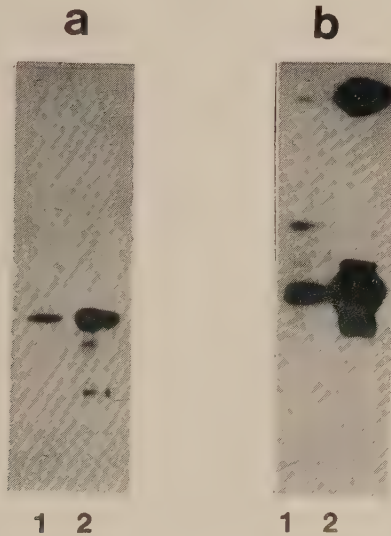


Abb. 9: Hybridisierung chromosomaler DNS aus *M. voltae* und des rekombinanten Plasmids pS1 mit dem AvaI-Fragment aus pS1 (siehe Abb. 8), das einen sequenzgleich wiederholten tRNA^{Lys} -5S-rRNA- tRNA^{Asp} -Blöcke trägt.

- a) Spur 1: Chromosomale DNS aus *M. voltae* mit HindIII geschnitten;
Spur 2: DNS des Plasmids pS1 mit HindIII geschnitten.
- b) Spur 1: Chromosomale DNS aus *M. voltae* mit AvaI/HindIII geschnitten;
Spur 2: DNS des Plasmids pS1 mit AvaI/HindIII geschnitten.

Die Anordnung der 5S rRNS-Gene und tRNS-Gene auf pS1 spiegelt also tatsächlich ihre Organisation im *M. voltae* Genom wider. Das Vorhandensein zweier 5S rRNS-Sequenzen erklärt das stärkere Hybridisierungssignal des 4,7 kb HindIII-Fragments in Abbildung 5 gegenüber dem 2,65 kb HindIII-Fragment.

Wie bereits beschrieben, besitzt *M. vannielii* ebenfalls ein "extra" 5S RNS-Gen. Dieses Gen ist ebenfalls mit sieben tRNS-Genen in einer Operonstruktur zusammengefaßt (Wich et al., 1984). Beides, sowohl die Abfolge wie die Sequenz der kodierten Gene ist hoch konserviert. Der einzige Unterschied in der Anordnung der Gene der beiden Organismen ist, daß in *M. vannielii* nur die Sequenzen der tRNS^{Lys} und tRNS^{ASP} zweifach im Operon wiederholt sind und nicht der gesamte Block tRNS^{Lys}-5S rRNS-tRNS^{ASP} wie in *M. voltae*.

Wie Abbildung 10 zeigt, sind die kodierenden Bereiche der beiden Gencluster in *M. voltae* und *M. vannielii* fast vollständig konserviert. Die Sequenzen der tRNS^{Thr} und tRNS^{Pro} weichen von denen in *M. vannielii* in drei Positionen ab, die von der tRNS^{Lys} und tRNS^{Tyr} in zwei bzw. einer Position, die tRNS^{ASP}-Sequenzen sind identisch. Von keinem dieser Unterschiede ist zu erwarten, daß er die Sekundärstruktur des tRNS-Moleküls verändert: ausnahmslos liegen sie innerhalb ungepaarter Bereiche oder sie werden durch kompensatorische Austausche ausgeglichen. Die intercistronischen Bereiche zwischen den kodierenden Regionen sind dagegen weder in Länge noch in Nukleotidsequenz konserviert (siehe Abb. 8 und Wich et al., 1984).

Wie schon für *M. vannielii* und *H. volcanii* beschrieben (Wich et al., 1984; Gupta, 1984), besitzt die tRNS^{Tyr} aus *M. voltae* im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen tRNS^{Tyr}-Sequenzen aus Eubakterien (Sprinzl et al., 1985a,b), keinen verlängerten Extraarm. Dies ist eine Eigenschaft, die diese archaebakteriellen tRNS-Sequenzen mit denen eukaryontischer cytoplasmatischer tRNS^{Tyr} teilen.

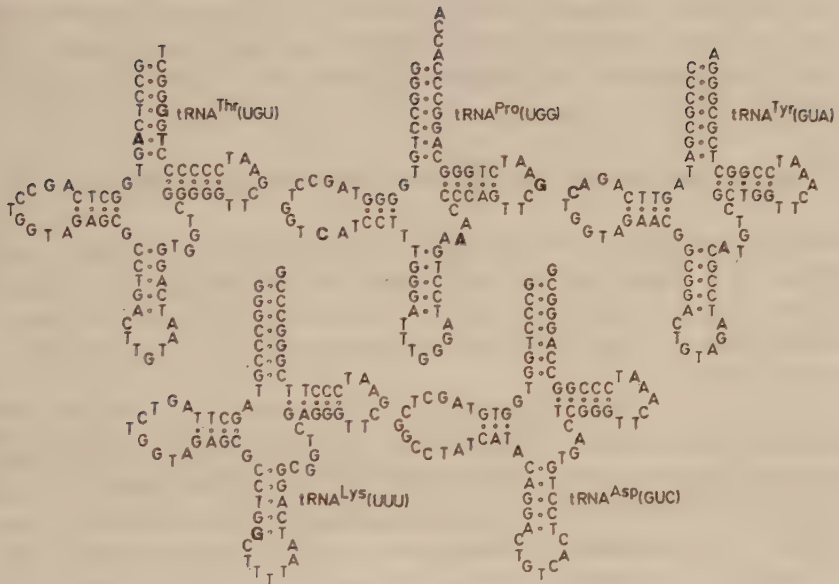


Abb. 10: Kleeblattstrukturen der tRNA aus *M. voltae*:

Fettgedruckte Buchstaben kennzeichnen Basen, die von den tRNA-Gensequenzen des tRNA/5S rRNA-Operons von *M. vannielii* abweichen (Wich et al., 1984).

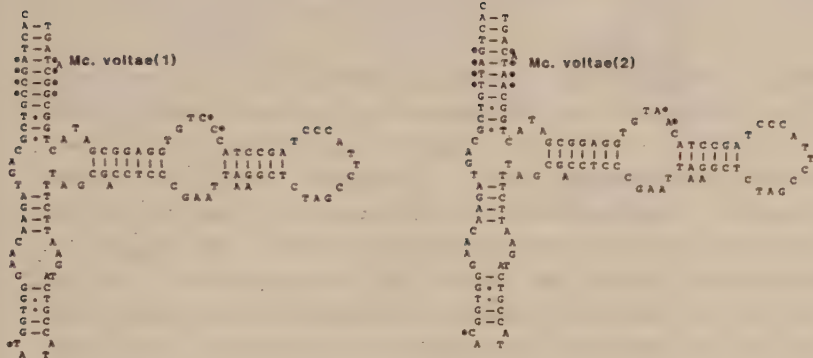
Die tRNS^{Pro}-Gensequenz aus *M. voltae* weist, wie die aus *M. vannielii*, ein 3' CCA-Ende auf. Da die Homologie außerhalb der kodierenden Bereiche sehr gering ist, ist diese Konservierung ein deutlicher Hinweis dafür, daß das 3' CCA-Ende tatsächlich in die reife tRNS-Struktur transkribiert wird und nicht ein rein statistisches Vorhandensein darstellt (siehe auch Kap. I.3.).

3. Sequenzanalyse des 5S rRNS-Gens des 16S-23S-5S rRNS-Operons

Das 5S rRNS-Gen des rRNS-Operons wurde teilweise mit Hilfe der Technik von Maxam und Gilbert (1980) und teilweise, nach Subklonierung in pUC19 über die in Abbildung 7 angegebene ScaI-Schnittstelle, durch Kettenabbruchsynthese nach Sanger (1977) sequenziert.

Abbildung 11a zeigt die ermittelte Sequenz dieses 5S rRNS-Gens und zum Vergleich die Sequenz des "extra" 5S rRNS-Gens in der von Fox und Woese (1975) vorgeschlagenen Sekundärstruktur. Die Primär- und Sekundärstrukturelemente sind charakteristisch für die Gruppe 1 archaebakterieller 5S rRNS (Fox et al., 1982).

Wie bei *M. vannielii* (Wich et al., 1984) findet man auch in *M. voltae* einen außergewöhnlich hohen Sequenzpolymorphismus. Das "extra" 5S rRNS-Gen von *M. voltae* weicht in seiner Sequenz von der Sequenz des dem rRNS-Operon zugeordneten 5S rRNS-Gens in nicht weniger als 11 der 120 Basen ab (Abb. 11a). Keiner dieser Unterschiede resultiert jedoch in einer veränderten Sekundärstruktur. Abbildung 11b zeigt, daß die Sequenzen der 5S rRNS-Gene der rRNS-Operonen auf der einen Seite und der "extra" 5S rRNS-Gene auf der anderen zwischen den beiden Spezies *M. vannielii* und *M. voltae* hoch konserviert sind. Dies führt zu der ungewöhnlichen Tatsache, daß die beiden 5S rRNS-Gentypen in einem Organismus (das heißt, 5S rRNS-Gene des rRNS-Operons und "extra" 5S rRNS-Gene) miteinander weniger verwandt erscheinen als die jeweiligen Gentypen in den beiden Organismen (Abb. 11b).



TGATACGGGCGTCATAGCGGAGGTGTCCCATCCGATCCCATTCGGAAATTAAGCCCTCCAGCGA	TTTCTTAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTCCGATCAC	M. voltae(1)
TGATACGGGCGTCATAGCGGAGGTGTAACTCCGATCCCATTCGGAAATTAAGCCCTCCAGCGA	TTTCTTAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTCCGATCAC	M. vannielli(1)
TGATACGGGCGTCATAGCGGAGGTGTAACTCCGATCCCATTCGGAAATTAAGCCCTCCAGCGA	TTTCTTAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTCCGATCAC	M. voltae(2)
TGATACGGGCGTCATAGCGGAGGTGTAACTCCGATCCCATTCGGAAATTAAGCCCTCCAGCGA	TTTCTTAAGTACTGCCATATGGTGGGAACAAGATGACGCTCCGATCAC	M. vannielli(2)

Abb. 11: Vergleich der "extra" 5S rRNS-Gene (1) und der 5S rRNS-Gene der rRNS-Operonen (2) aus *M. voltae* und *M. vannielli* (Wich et al., 1984; Jarsch und Böck, 1986):

Abweichende Basen sind durch Punkte bzw. Sterne gekennzeichnet. Zwei in den "extra" 5S rRNS-Genen bzw. den Genen der rRNS - Operonen besonders konservierte Sequenzbereiche sind umrahmt.

III. Kartierung der Transkriptionssignale für verschiedene Gene stabiler RNS aus *M. vanielii*

Wie bereits erwähnt, war einer der Beweggründe, diese große Anzahl an tRNS-Genen aus *Methanococcus* zu untersuchen, der, eine statistisch signifikante Anzahl gleichregulierter Transkriptionseinheiten an die Hand zu bekommen. Durch eine Analyse der 5' und 3' flankierenden Bereiche sollten Hinweise auf DNS kodierte Transkriptionssignale erhalten werden. DNS-Sequenzen, die spezifische Signale der Transkription darstellen, sind im Bereich der Transkriptionsinitiations-Region beziehungsweise der Transkriptionsterminations-Region zu erwarten. Diese Bereiche wurden mit Hilfe von Nuklease S1-Kartierungen bestimmt.

1. Kartierung des Transkriptionsstarts einer rRNS-Transkriptionseinheit

Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, daß *M. vanielii* sich phänotypisch wie eine eubakterielle relA Mutante verhält: Die RNS-Synthese läuft weiter, wenn die Proteinsynthese auf Ebene der Beladung der tRNS oder der Bildung der Peptidbindung blockiert wird (Beauclerk et al., 1985). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß bei Unterbrechung der Proteinsynthese durch das Antibiotikum Pseudomonadat rRNS-Vorläufermoleküle angehäuft werden (Dr. H. Hummel, persönliche Mitteilung). Dieses System ist für S1-Kartierungen interessant, da zum einen die Schwierigkeit, daß ribosomale Vorläufermoleküle sehr rasch prozessiert werden, vermieden werden konnte. Zum anderen lassen diese Versuche auch Rückschlüsse auf die Natur der in Gegenwart von Pseudomonadat akkumulierten ribosomalen Vorläufer zu. Eine schematische Darstellung der durchgeführten Experimente ist der Abbildung 12a zu entnehmen.

Plasmid pMV1, das ein vollständiges rRNS-Operon aus *M. vanielii* trägt (Jarsch et al., 1983), wurde mit der Restriktionsendonuklease NcoI nahe dem 5' Ende des 16S rRNS-Gens

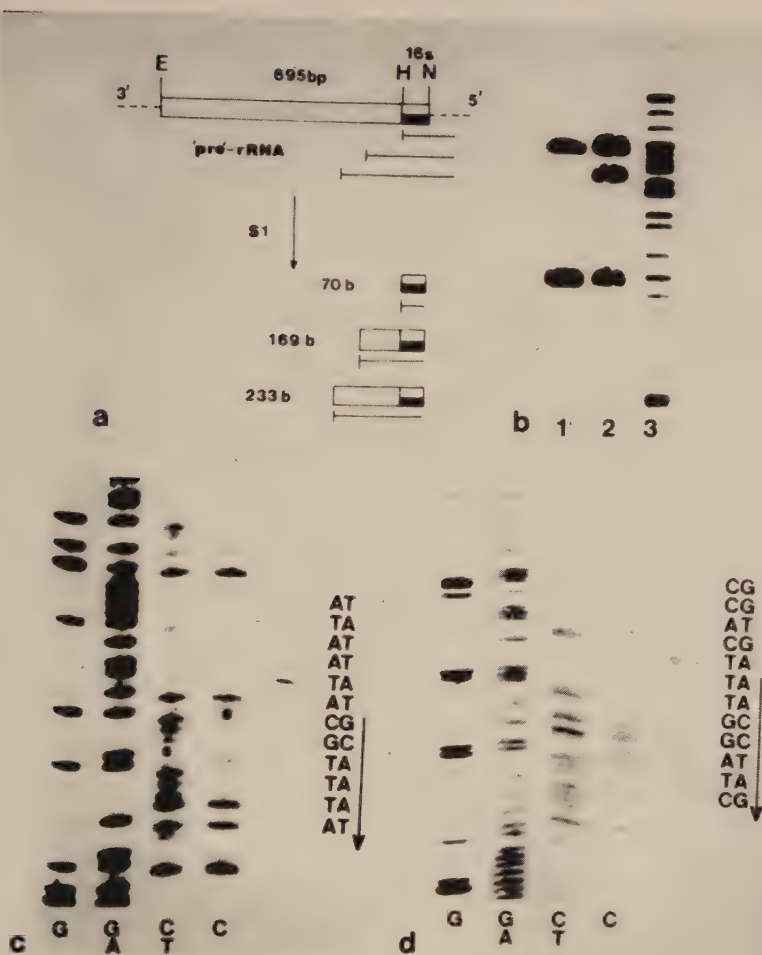


Abb. 12: Nuklease S1-Kartierung der 5' Enden prä-ribosomaler rNS-Transkripte aus *M. vanielii*:

a) Schematische Darstellung der Prozedur: Ein 695 Basenpaar EcoRV (E)/NcoI (N)-Fragment (5'markiert an der NcoI-Schnittstelle), das die Nukleotide -625 bis +70 relativ zum 16S rRNS-Gen umfaßt, wurde mit der Gesamt-RNS aus *M. vanielii* hybridisiert und mit Nuklease S1 abgebaut. Die Länge der vor Nuklease S1 geschützten Fragmente ist angegeben.

b) Autoradiogramm der vor Nuklease S1-Abbau geschützten DNS-Fragmente: Spur 1, RNS aus Kontrollzellen; Spur 2, RNS aus *Pseudomonas*-behandelten Zellen; Spur 3, Molekulargewichtsstandard (pBR322 x HpaII, 5' endmarkiert mit $^{32}\text{PO}_4$).

c) und **d)** Exakte Längenbestimmung des längsten geschützten DNS-Fragments (c) und des unter *Pseudomonas* angehäuften Prozessierungsintermediats (d) durch elektrophoretischen Vergleich mit der Sequenzleiter des originalen DNS-Fragments.

geschnitten. Das DNS-Fragment wurde 5' radioaktiv markiert und mit EcoRV nachgeschnitten, so daß ein EcoRV-NcoI-Fragment (695 Basenpaare) entsteht, das nur am kodierenden DNS-Strang markiert ist. Dieses wurde denaturiert, mit Gesamt-RNS aus *M. vannielii* hybridisiert und mit Nuklease S1 abgebaut. Die Reaktionsprodukte wurden in Harnstoff-Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen analysiert (Abb. 12b). Drei Fragmente werden durch RNS aus *Pseudomonadat*-behandelten Zellen vor Nuklease S1-Abbau geschützt. Ihre exakte Lage wurde durch Elektrophorese auf Sequenzgelen, mit der Sequenzleiter des EcoRV-NcoI-Fragments als Längenstandard, bestimmt. Die Position des 5' Endes wurde gegenüber der Sequenz um 1,5 Nukleotide korrigiert (Hentschel et al., 1980). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12c,d dargestellt:

- Das 5' Ende der längsten vor Abbau schützenden RNS kartiert bei einem G in Position 233 oberhalb der NcoI-Schnittstelle, innerhalb der Sequenz 5' TGCAAAT³ des nichtkodierenden (RNS-gleichen) DNS-Stranges.
- Das zweitlängste Fragment wird durch eine RNS geschützt, deren 5' Ende 169 Nukleotide oberhalb der NcoI-Schnittstelle bei einem A in der Sequenz 5' GTGAAAC³ liegt. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um ein Prozessierungsintermediat des längeren, primären Transkripts handelt (siehe nächstes Kapitel).
- Das kürzeste geschützte DNS-Fragment entspricht dem 5' Ende der reifen 16S rRNS.

Wie in Abbildung 12b deutlich zu sehen ist, besteht ein Unterschied in dem S1-Abbaumuster, abhängig davon, ob die schützende RNS aus Zellen mit oder ohne *Pseudomonadat*-Behandlung präpariert wurde. RNS aus Antibiotikum-behandelten Zellen enthält eine größere Menge des putativen, primären Transkripts und eine weit höhere Menge des Prozessierungsintermediates.

Eine Wiederholung der Experimente mit einem 624 Basenpaar EcoRV-HpaII-Fragment, das an der HpaII-Schnittstelle vier Basenpaare innerhalb des 16S RNS-Gens markiert wurde, führte zu den gleichen Ergebnissen (nicht gezeigt).

Die genaue Lage der 5' Enden der Transkripte auf der DNS ist in Abbildung 14 gezeigt.

2. Nachweis des primären Transkripts durch in vitro "cap" Markierung

Die Anreicherung des vermuteten primären Transkripts und des möglichen Prozessierungsintermediates unter Pseudomonadateinfluß ermöglichte einen Versuch, der bis jetzt nur für stark exprimierte virale RNS in dieser Form beschrieben wurde (Venkatesan und Moss, 1981; Moss, 1981). Um zu beweisen, daß es sich bei der längsten gefundenen RNS tatsächlich um das primäre Transkript handelt, wurde eine weitere S1-Kartierung durchgeführt, nur daß diesmal nicht das DNS-Fragment, sondern die Gesamt-RNS aus *Methanococcus* 5' markiert wurde. Diese Markierung wurde mit Hilfe des Enzyms RNS-Guanylyltransferase aus Vaccinia Virus und α -³²P-GTP durchgeführt. Nur RNS-Spezies mit Di- oder Triphosphaten am 5' Ende (d.h. primäre Transkripte, nicht aber Prozessierungsintermediate) sind Substrate dieses Enzyms, das in vivo die Bildung der sogenannten "Cap-Struktur" (ein 7-Methyl-Guanosyl-Triphosphat) an den 5' Enden eukaryontischer, primärer RNS-Transkripte katalysiert (Moss, 1981). Eine S1-Kartierung, durchgeführt mit in vitro "cap"-markierter RNS, sollte also nur primäre Transkripte und nicht Prozessierungsintermediate radioaktiv nachweisen.

Das unmarkierte EcoRV-NcoI-Fragment wurde dazu mit "cap"-markierter Gesamt-RNS aus *M. vannielii* Zellen (mit oder ohne Pseudomonadat-Behandlung) hybridisiert und mit Nuklease S1 und der einzelstrangspezifischen RNase A abgebaut. Als Kontrolle wurde eine S1-Kartierung mit markierter DNS und der gleichen RNS ohne Markierung durchgeführt.

Das S1 resistente RNS-DNS-Hybrid, das in dem Experiment mit "cap"-markierter RNS erhalten wurde (Abb. 13, Spur 2), wandert im Polyacrylamidgel an annähernd der gleichen Stelle, wie das längste vor S1-Abbau geschützte Fragment in der Kontrolle mit markierter DNS (Abb. 13, Spur 3). Das "gecappte" Transkript erscheint, wie die Abbildung zeigt, um wenige Nukleotide länger. Dies ist der bekannten Beobachtung zuzuschreiben, daß die "Cap-Struktur" die Nuklease sterisch am Abbau hindert (Moss, 1981). Aufgrund dieses Experiments ist gerechtfertigt, das längste in der S1-Kartierung nachgewiesene Transkript als das primäre Transkript dieses rRNS-Operons zu betrachten.

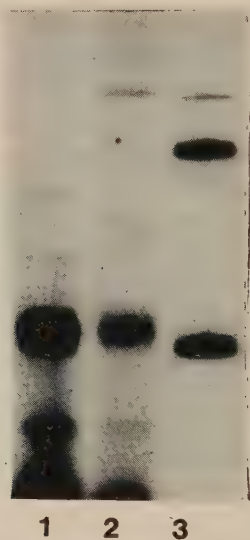


Abb. 13: Autoradiogramm Nuklease S1 resistenter RNS-DNS-Hybride mit 5' "cap"-markierter Gesamt-RNS aus *M. vanniellii* und unmarkierter DNS: Das experimentelle Vorgehen entspricht dem in Abb. 12 beschriebenen mit der Ausnahme, daß die RNS mit Hilfe der Vaccinia Virus RNS-Guanylyltransferase 5' markiert wurde.
Spur 1: Markierte RNS aus *M. vanniellii*-Zellen ohne Pseudomonadat-Behandlung.
Spur 2: Markierte RNS aus Zellen nach Pseudomonadat-Behandlung.
Spur 3: S1-Kartierung mit 5' markierter DNS und unmarkierter RNS aus Zellen nach Pseudomonadat-Behandlung.

Das zweitlängste Transkript, das in der S1-Kartierung mit markierter DNS nachgewiesen wird (Abb. 12b; Abb. 13, Spur 3), fehlt in dem Experiment mit 5'guanylylierter RNS (Abb. 13, Spur 1 und 2), obwohl es in den Antibiotikum-behandelten Zellen im Vergleich zum primären Transkript in großem Überschuß vorliegt. Dies zeigt, daß es tatsächlich ein Prozessierungsintermediat des längeren, primären Transkripts darstellt. Ein Vergleich der Spur 2 ("cap"-markierte RNS nach Antibiotikumbehandlung) und Spur 1 ("cap"- markierte RNS aus Kontrollzellen) unterstreicht den aus den Ergebnissen der Abbildung 12 abgeleiteten Schluß, daß neben dem Prozessierungsintermediat auch das primäre Transkript der ribosomalen RNS akkumuliert, wenn die Proteinsynthese gehemmt wird.

Die Ergebnisse der S1-Analysen sind in Abbildung 14 zusammengefaßt. Der Startpunkt des primären Transkripts liegt bei einem G, 159 Basenpaare oberhalb des 5' Endes des 16S rRNS kodierenden Bereiches in einer Region, die in den beiden sequenzierten rRNS-Operonen aus *M. vanielii* konserviert ist (Jarsch, 1985). Die Schnittstelle des Prozessierungsintermediates kartiert innerhalb einer kurzen Diskontinuität des langen basengepaarten Bereichs, der die reife 16S rRNS umgibt.

LeuAsnGluValAspLysLeuValThrAspGlnLeuLysLys##

pmV1 TTAATGAAGTTGATAAACTTGTACGGATCAACTGAAAAATAACTTATAAACTCTTAAAAATTTATGTTACATACCTAAAAACAATA -186

pmV15 ACACITTTTTTTATTATTTTTTTATATACATATTTTCGAGTATTATTATTTTTTGAGGATTTTAAATTATGTTACATACCTAAAAACAATA

pmV1 CATATTACAACAGCTTTTCATATTATGCAAAATCAAAGTGATCGCC TGAACATAACTCACTCAGGTGTGATGTAAGCCCAACAATCTAGGTGA -96

pmV15 CATATTACAACAGCTTTTCATATTATGCAAAATCAAAGTGATCGCC TGAACATAACTCACTCAGGTGTGATGTAAGCCCAACAATCTAGGTGA

pmV1 AACCTAGATAGCGACCAATAAAATGTCATTTCCTTTAATGTAAA AATGACGTACTCCACGAGAGTGTGAGCGTAAAAATCTTTTACGCC -6

pmV15 AACCTAGATAGCGACCAATAAAATGTCATTTCCTTTAATGTAAA AATGACGTACTCCACGAGAGTGTGAGCGTAAAAATCTTTTACGCC

1 → Start 16S rRNA

pmV1 ACAAAATTCCG

pmV15 ACAAAATTCCG

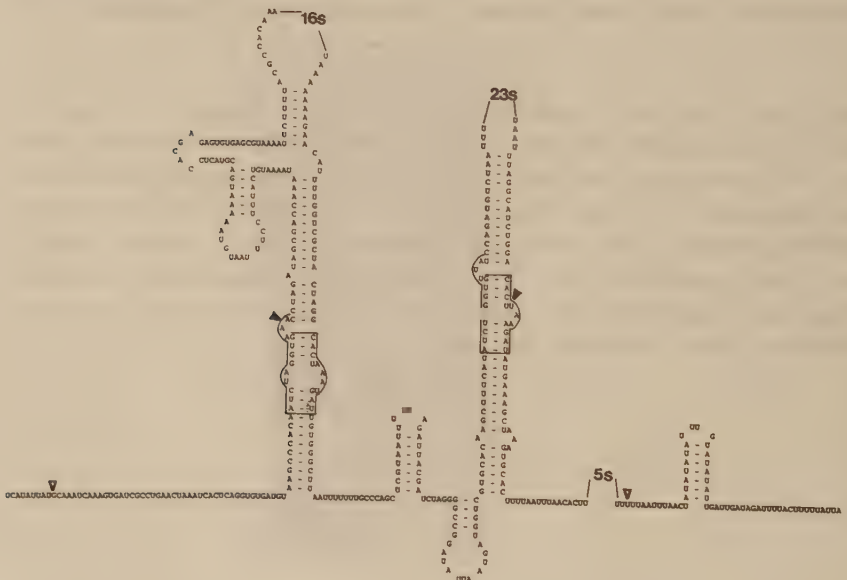


Abb. 14: (a) Vergleich der 5' flankierenden Sequenzen zweier rRNS-Transkriptionseinheiten aus *M. vanielii* (Jarsch und Böck, 1985): Identische Basen sind durch Sterne markiert. Die ersten Nukleotide der 16S rRNS-Gene sind umrahmt. Das 3' Ende eines offenen Leserahmens in pmV1 ist durch drei Kreuze gekennzeichnet. Das 5' Ende des primären Transkripts und eines Prozessierungsintermediates der prä-rRNS ist durch ein offenes bzw. ein geschlossenes Dreieck gekennzeichnet. (b) Mögliche Sekundärstruktur des Transkripts des rRNS-Operons aus pmV15: Die Start- und Endpunkte des primären Transkripts sind durch offene Dreiecke, das 5' Ende des Prozessierungsintermediates der 16S rRNS und das 3' Ende eines Prozessierungsintermediates der 23S rRNS durch gefüllte Dreiecke markiert.

3. Kartierung des Transkriptionsterminations-Bereiches eines rRNS-Operons

Um das 3' Ende des Transkripts eines rRNS-Operons aus *M. vanniellii* zu bestimmen, wurde eine S1-Kartierung mit einem DNS-Fragment, das an einer DdeI-Schnittstelle 142 Basenpaare oberhalb des 3' Endes des 23S rRNS-Gens 3'markiert war, durchgeführt. Gesamt-RNS wurde mit dem 600 Basenpaar DdeI-BclI-Fragment, das sich bis 270 Basenpaare 3' des 5S rRNS-Gens erstreckt, bei einer Temperatur von 32°C hybridisiert (Abb. 15a). Drei DNS-Fragmentgrößen wurden vor S1-Abbau durch RNS geschützt. Das kürzeste Fragment entspricht dem 3' Ende der reifen 23S rRNS (nicht gezeigt). Ein längeres Fragment liegt mit seinem 3' Ende an einem T in Position 163 unterhalb der DdeI-Schnittstelle. Es stellt vermutlich ein Prozessierungsintermediat der 23S rRNS dar. Dafür spricht auch, daß das Transkript-Ende sich in der oben erwähnten Diskontinuität des langen, 16S wie 23S rRNS umgebenden, basengepaarten Bereiches befindet (Abb. 14).

Das längste, in der S1-Kartierung nachgewiesene Transkript sollte theoretisch das primäre Transkript darstellen. Die Auftrennung der Sequenzleiter des DdeI-BclI-Fragments ist in dem kritischen Bereich zu schlecht, um eine Bestimmung der Fragmentlänge auf eine Genauigkeit von einem Basenpaar zuzulassen, doch liegt das 3' Ende mit Sicherheit innerhalb einer Oligo-dT-Sequenz, unmittelbar 3' der für 5S rRNS kodierenden Region. Da im weiteren 3' Bereich kein anderes Signal zu finden ist, scheint die Transkription in dieser Oligo-dT-Region zu terminieren.

- siehe nachfolgend Abbildung 15 a-c -

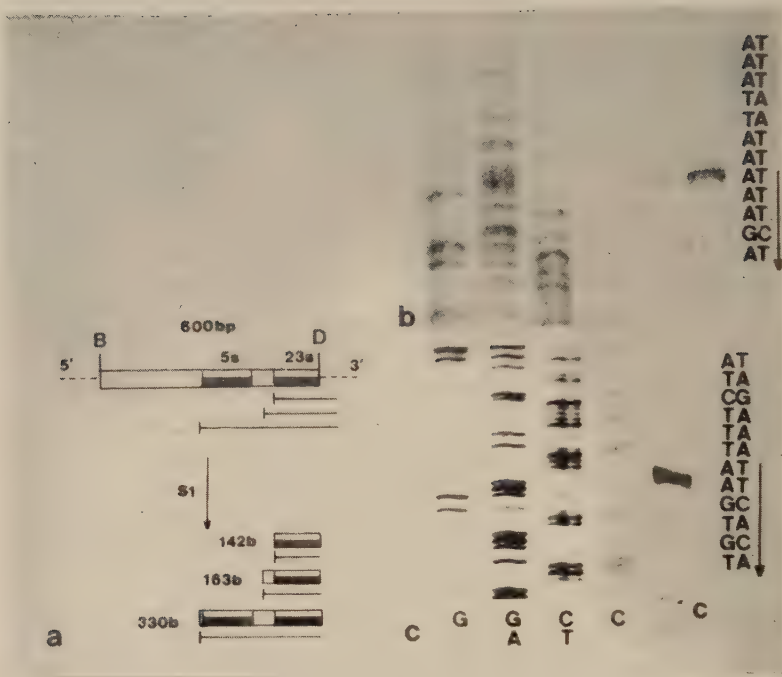


Abb. 15: Nuklease S1-Kartierung der 3' Enden prä-ribosomaler RNS-Transkripte aus *Methanococcus*:

- Experimentelles Vorgehen: Ein 600 Basenpaar BclI(B)-DdeI (D) Fragment (3' markiert an der DdeI-Schnittstelle) mit 270 Basenpaaren 3' flankierend zu dem 5S rRNS-Gen des rRNS-Operons wurde mit RNS aus *M. vannielii* hybridisiert und mit Nuklease S1 abgebaut. Die Länge der geschützten DNS-Fragmente ist angegeben.
- Kartierung des 3' Endes des primären Transkripts. Die Längenbestimmung erfolgte durch Vergleich mit der Sequenz des Original-DNS-Fragments.
- Kartierung des 3' Endes eines rRNS-Prozessierungsintermediats zwischen 23S rRNS und 5S rRNS.

4. Kartierung des Transkriptionsstarts zweier tRNS-Transkriptionseinheiten

Um die Transkriptionsstartstelle des rRNS-Operons mit denen anderer Gene für stabile RNS in *Methanococcus* zu vergleichen, wurden S1-Kartierungen für zwei tRNS-Transkriptionseinheiten durchgeführt. Für diese Analysen wurden die putativen Operonen, die in den Plasmiden pMV4 (Wich et al., 1984) und pMT21 (siehe Kap. I) kloniert vorlagen, ausgewählt. pMV4 wurde an einer MaeIII-Schnittstelle im nichtkodierenden Bereich zwischen der ersten und zweiten tRNS des tRNS/5S RNS-Clusters markiert (Abb. 16a). Das 590 Basenpaar HincII-MaeIII-Fragment wurde mit Gesamt-RNS aus *Methanococcus* bei 42°C hybridisiert. pMT21 wurde an einer AvaI-Schnittstelle innerhalb des zweiten tRNS-Gens 5' markiert (Abb. 16a). Die Hybridisierungstemperatur für das 566 Basenpaar ClaI-AvaI-Fragment war 51°C. Die Ergebnisse des S1-Abbaus sind in Abbildung 16b gezeigt; die exakte Längenbestimmung zeigt Abbildung 16c und 16d.

Nach diesen Analysen kartiert das 5' Ende des längsten Transkripts von pMV4 in Position 101 oberhalb der markierten Restriktionsstelle im ersten G der Sequenz 5'TGCGAAC^{3'} (Abb. 16c). Das längste Transkript des tRNS-Operons aus pMT21 hat sein 5' Ende bei einem G in Position 174 5' zur AvaI-Stelle, in der Sequenz 5'TGCTCTT^{3'} (Abb. 16d).

Die schwachen Banden in Spur 1 und 2 der Abbildung 16b stellen vermutlich Prozessierungsintermediate der Promotor-proximalen tRNS-Gene dar. Sie liegen in beiden Fällen nahe dem 5' Ende der ersten, für tRNS kodierenden Region der polycistronischen Einheiten. Die stark markierte Bande in Spur 3 der Abbildung 16b (pMT21) resultiert aus dem Schutz des DNS-Fragments durch die reife tRNS^{Glu}. Zumindest für pMT21 beweisen diese Daten, daß die tRNS-Gene in einer transkriptionellen Einheit zusammengefaßt sind.



Abb. 16: (a) Experimentelles Vorgehen: Ein 590 Basenpaar HincII(H)/MaeIII (M) Fragment im 5' Bereich des tRNA-5SrRNA-Operons (Wich et al., 1984) und ein 566 Basenpaar Clai(C)/AvaI(A) Fragment im 5' Bereich des tRNA-Operons aus pMT21 wurden an der MaeIII- bzw. AvaI-Restriktionsschnittstelle markiert. Die Längen der durch Methanococcus Gesamt-RNS vor Nuklease S1-Abbau geschützten Fragmente sind angegeben. (b) Autoradiogramm der Nuklease S1-resistenten RNS-DNS-Hybride der beiden tRNA-Transkriptionseinheiten. Spur 1: DNS des tRNA-Operons aus pMT21 (eine zweite schwache Bande ist durch einen Pfeil markiert); Spur 2: DNS des tRNA-5SrRNA-Operons; Spur 3: Größenmarker pBR322 x HpaII. (c) Bestimmung der exakten Länge der putativen primären Transkripte des tRNA-Operons (c) und des tRNA/5S rRNA-Operons (d).

5. Konservierte DNS-Sequenzen im Bereich der Transkriptionsinitiation und -termination

Wenn die Synthese stabiler RNS-Spezies in *Methanococcus* durch spezifische, in der DNS-Sequenz kodierte Signale kontrolliert wird, so sollte man in den flankierenden Bereichen der Transkriptionsinitiation und -termination konservierte Primärstrukturelemente erwarten.

Die 5' Bereiche der sechs tRNS-Transkriptionseinheiten aus *M. vannielii*, eines rRNS-Operons aus *M. vannielii* (Jarsch, 1985) und des tRNS/5S rRNS-Operons aus *M. vannielii* und *M. voltae* wurden dazu miteinander verglichen. Tatsächlich ist, wie Abbildung 17 zeigt, jeder der neun Transkriptionseinheiten eine hochkonservierte Sequenz von 16 Nukleotiden in einem Abstand von 30 bis 50 Basenpaaren 5' zum jeweils ersten Gen der Transkriptionseinheit vorangestellt (Box A). 23 bis 24 Basenpaare von dieser "Box A" in Richtung auf die Strukturgene, liegt ein zweiter Homologiebereich (Box B), in dem zumindest drei Nukleotide konserviert sind. In den beiden tRNS-Gen-Clustern, in denen tRNS-Gene eng benachbart zueinander liegen, aber unterschiedliche transkriptionelle Orientierung aufweisen (pMT11 und pMT22; siehe Abb. 3a,b), finden sich in den kurzen intercistronischen Bereichen (115 bzw. 146 Basenpaare) beide Homologieblöcke zweifach und ebenfalls mit divergenter Orientierung (Abb. 3a,b).

Wie die S1-Kartierungen zeigen, erfolgt der Start der Transkription an strukturell identischer Stelle, namentlich am ersten G der Homologiebox B (Abb. 17). Der Transkriptionsstart der Gene stabiler RNS in *Methanococcus* besitzt somit eine konservierte Sequenz. Jeweils in definiertem und konstantem Abstand von 23 bis 24 Basenpaaren "stromauf" des Startnukleotids liegt in der Transkriptionsinitiations-Region aller untersuchten Transkriptionseinheiten ein zweites, strikt konserviertes Primärstrukturelement, nämlich Box A.

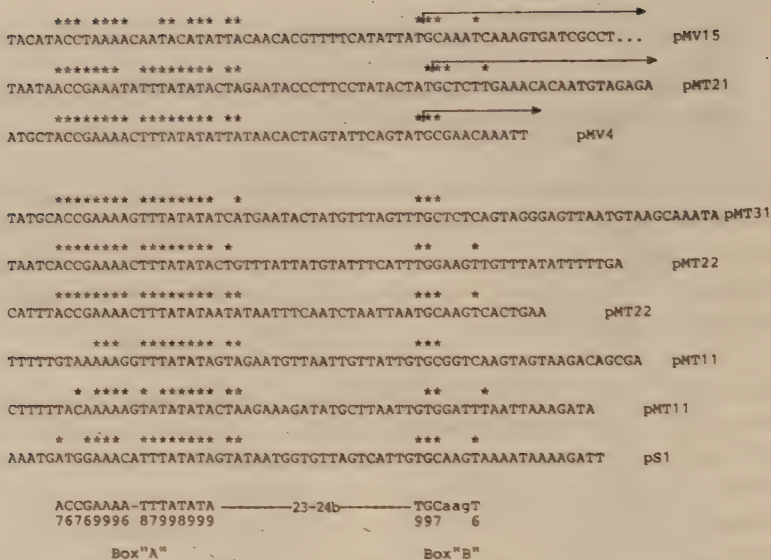


Abb. 17: Vergleich der 5' flankierenden Bereiche der Gene stabiler RNS aus *M. vanniellii* und *M. voltae*: Pfeile über der Sequenz kennzeichnen die Transkriptionsstartpunkte. Konservierte Nukleotide sind durch Sterne markiert. Eine abgeleitete Konsensussequenz ist unter den Sequenzen angegeben.

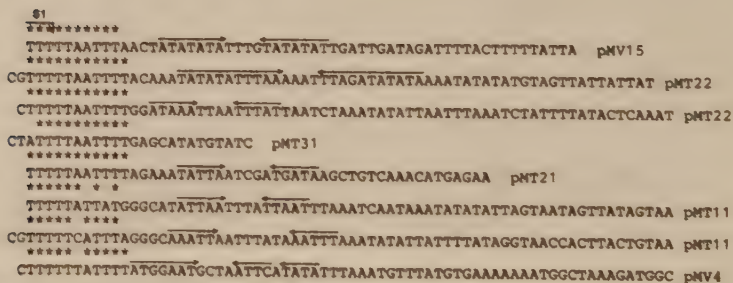


Abb. 18: Vergleich der 3' flankierenden Bereiche der Gene stabiler RNS aus *M. vanniellii*: Das 3' Ende des rRNS-Transkripts ist über der Sequenz gekennzeichnet. Mögliche "inverted repeat" Strukturen sind durch Pfeile angegeben. Konservierte Nukleotide sind durch Sterne markiert.

Die oben beschriebenen Nuklease S1-Analysen des 3' Endes des rRNS-Operons aus *M. vannielii* zeigten, daß die Termination der Transkription innerhalb eines Oligo-dT-Blockes 3' zum 5S rRNS-Gen dieses Operons erfolgt. Vergleicht man die unmittelbar 3' flankierenden Bereiche aller sequenzierten Transkriptionseinheiten der Gene stabiler RNS aus *M. vannielii*, so findet man an identischer Stelle nach dem distalen Gen jeder Transkriptionseinheit einen sequenzgleichen Oligo-dT-Bereich von 11 Basenpaaren (Abb. 18). Jeder dieser Blöcke ist von einer "inverted repeat" Struktur gefolgt, doch sind die gepaarten Bereiche dieser Sekundärstrukturen sehr kurz und AT-reich, so daß ihre in vivo Bedeutung fraglich erscheint.

IV. Bestimmung des Bindungsbereiches einer RNS-Polymerase aus *M. vannielii* an Gene stabiler RNS

Um die biologische Signifikanz der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen konservierten DNS-Sequenzen biochemisch zu unterbauen, wurde der Bindungsort der RNS-Polymerase an die Promotorregion der Gene aus *M. vannielii* durch Exonuklease III-Analysen bestimmt.

Die Reinigung der verwendeten RNS-Polymerase wurde von Dr. Michael Thomm an der Universität Regensburg durchgeführt, und zwar nach der von Thomm und Stetter (1985) beschriebenen Methode. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Thomm durchgeführt.

1. Exonuklease III - Protektionsanalysen eines rRNS-Operons und eines tRNS-Operons aus *M. vannielii*

Um die Bindungsstelle der RNS-Polymerase an Promotoren der Gene stabiler RNS zu bestimmen, wurde der binäre Komplex zwischen RNS-Polymerase und DNS-Molekülen mit Exonuklease III inkubiert. Proteine, die fest an spezifische Sequenzen der DNS gebunden sind, blockieren die 3' → 5' exonukleolytische Abbaureaktion dieser Nuklease. Der Bereich, den die RNS-Polymerase auf der DNS überdeckt, kann abgeleitet werden, indem man in beiden Orientierungen diejenige Stelle am DNS-Fragment bestimmt, an der der exonukleolytische Abbau gestoppt wird (Siebenlist et al., 1980; Shalloway et al., 1980).

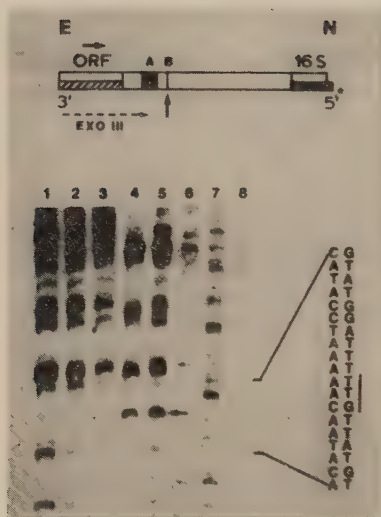
Um das 5' Ende des rRNS-Polymerase-Bindungsbereiches an einem rRNS-Operon und an einem tRNS-Operon in *Methanococcus* zu bestimmen, wurde der kodierende DNS-Strang innerhalb des 16S rRNS-Genes in pMV1 (Jarsch et al., 1983) und innerhalb des tRNS^{Arg}-Gens in pMT21 (siehe Kap. I) 5' markiert (Abb. 19a,b). Die markierten DNS-Fragmente wurden in Anwesenheit und in Abwesenheit der RNS-Polymerase mit Exonuklease III inkubiert. Die Abbauprodukte wurden auf Harnstoff-Polyacrylamidgelen verglichen. Wie Abbildungen 19a, Spur 1-3, und 19b, Spur 4-6,

zeigen, erhält man in Experimenten, die ohne RNS-Polymerase durchgeführt wurden, ein fragment-spezifisches Abbaumuster. Dies ist auf Primär- und Sekundärstruktur bedingte "Pausierungs"-Stellen der Exonuklease III in der DNS zurückzuführen (Shalloway et al., 1980; Linxweiler und Hörz, 1982). Bei Zugabe von RNS-Polymerase entsteht in beiden Ansätzen eine zusätzliche Bande (Abb. 19a, Spur 4, 5; 19b, 7, 8). In einer Serie von Kontrollexperimenten ohne RNS-Polymerase mit verschiedenen Exonuklease III-Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden diese Banden nie nachgewiesen (nicht gezeigt). Dies zeigt, daß an einer spezifischen Stelle des rRNS-Operons und des tRNS-Operons die Exonuklease III durch gebundene RNS-Polymerase-Moleküle in ihrem Abbau blockiert wird. Damit steht auch im Einklang, daß die Banden, die aus "Pausierungs"-Stellen der Exonuklease resultieren, jenseits dieser Position abgeschwächt erscheinen.

Die Länge der geschützten DNS-Fragmente wurde durch Vergleich mit den DNS-Sequenzen der Ausgangsfragmente ermittelt. Das 5' Ende der RNS-Polymerase-Bindungsstelle liegt bei dem rRNS-Operon 31 $\pm$ 1 Basenpaare und bei dem tRNS-Operon 32 $\pm$ 1 Basenpaare 5' des durch S1-Kartierung bestimmten Transkriptionsinitiations-Punktes.

In analoger Weise wurde das 3' Ende der RNS-Polymerase-Bindungsstelle bestimmt. In diesem Fall wurde die DNS jedoch am 5' Ende des nichtkodierenden DNS-Strangs (Abb. 19c,d) markiert, so daß die gegenläufige Exonuklease III-Abbaurichtung nachgewiesen wird. Die stärkste Bande, die in Gegenwart von Polymerase erscheint und die damit die stärkste Blockierung der Exonuklease durch gebundene Polymerase anzeigt, ist in beiden Transkriptionseinheiten an identischer Stelle, nämlich 18 Basenpaare 3' zum Transkriptionsstart zu finden. Das Vorhandensein weiterer schwacher Banden im Abstand von 1 beziehungsweise 8 Basenpaaren zum Transkriptionsstart weist darauf hin, daß dieser Bereich nach dem Initiationspunkt der Transkription von der Polymerase weniger stark geschützt wird.

a



b

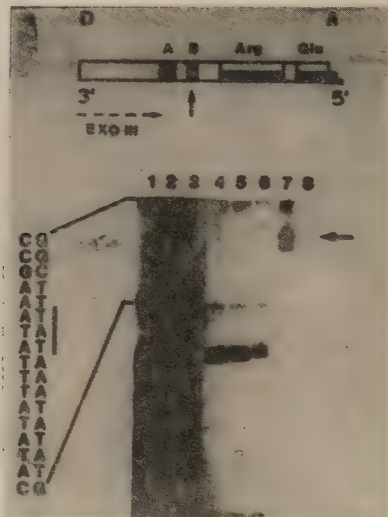


Abb. 19: Exonuklease III-"Footprinting-Analysen" des Bindungsbereichs der RNS-Polymerase aus *M. vanielii* an dem Promotor eines rRNS- und eines tRNS-Operons:

Unter jedem Autoradiogramm ist eine schematische Darstellung des verwendeten DNS-Fragments gezeigt. Kodierende Bereiche (gefüllte Balken), die beiden Sequenzen, die bei Promotoren der Gene stabiler RNS von *M. vanielii* konserviert sind ("Box" A und "Box" B), sowie die Startstelle der Transkription (Pfeil) sind angegeben. Ein Stern kennzeichnet denjenigen DNS-Strang, der radioaktiv markiert wurde, und ein durchbrochener Pfeil die dadurch nachgewiesene Richtung des Exonuklease III-Abbaus.

(a) 5' Ende der Bindungsstelle der RNS-Polymerase an einem rRNS-Operon von *M. vanielii*: Ein EcoRV (E)-NcoI (N)-Fragment wurde am codogenen DNS-Strang 5' markiert. Das Autoradiogramm zeigt die durch Exonuklease III erzeugten DNS-Fragmente: Spur 1-3: ohne RNS-Polymerase; Spur 4 und 5: mit 132 mU bzw. 66 mU RNS-Polymerase. Die Exonuklease III-Konzentrationen waren 1.500 (Spur 3, 4), 750 (Spur 2, 5) und 400 U/ml (Spur 1). Das geschützte DNS-Fragment ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Spuren 6, 7 und 8 zeigen als Längenvergleich die G, C + T und C-Sequenzreaktionen des unabgebauten DNS-Fragments.

Analysen mit diesem DNS-Fragment und der RNS-Polymerase aus *M. vannielii* ergaben keinen Hinweis auf eine spezifische Bindung dieses Enzyms (Abb. 20b, Spur 7, 8). Am gleichen DNS-Fragment konnte die 5' Grenze der Bindungsstelle der *E. coli*-Polymerase (von Dr. M. Thomm zur Verfügung gestellt) durch Exonuklease III "Footprinting" als 43 Basenpaare oberhalb der Transkriptionsstartstelle kartiert werden (Abb. 20b, Spur 9, 10). Dies entspricht dem 5' Ende der RNS-Polymerase-Bindungsstelle, wie es durch die gleiche Technik für andere *E. coli* Promotoren bestimmt wurde (Siebenlist et al., 1980).

3. Der Bindungsbereich der *Methanococcus*-RNS-Polymerase

Zusammenfassend lassen sich aus den geschilderten Experimenten folgende Schlüsse ziehen:

- a) Die RNS-Polymerase aus *M. vannielii* bindet nicht unspezifisch, sondern an definierte DNS-Sequenzen.
- b) Ein typischer und starker eubakterieller Promotor wird von der archaebakteriellen RNS-Polymerase nicht erkannt.
- c) Über Exonuklease III-Analyse ist es möglich, die spezifische Bindung einer *E. coli* Polymerase an eine *E. coli*-Promotorsequenz zu bestimmen. Das beweist die Validität dieses Systems für die Lokalisation DNS-gebundener Proteine.

Abbildung 21 zeigt die DNS-Sequenzen der Bereiche eines rRNS-Operons und eines tRNS-Operons, an die die RNS-Polymerase aus *M. vannielii* bindet.

Wie bereits erwähnt, liegt der Bindungsort in beiden Operonen an identischer Stelle. Die RNS-Polymerase aus *Methanococcus* bedeckt an ihrer spezifischen DNS-Bindungsregion (d.h. an ihrem Promotor) einen Bereich von 40 Basenpaaren von Nukleotid -32 bis Nukleotid +18 relativ zum Transkriptionsstart. Beide oben abgeleiteten Homologiebereiche, "Box" A wie "Box" B, sind damit tatsächlich Elemente dieses Promotorbereichs (Abb. 21). Das 5' Ende der RNS-Polymerase kartiert innerhalb der Box A-Homologieregion, die am höchsten konservierten acht Basen 5' TTTATATA 3'

werden durch die Polymerase geschützt. Dies ist ein Hinweis, daß sie eine essentielle Komponente dieses Bindungsbereiches darstellen (siehe Diskussion).

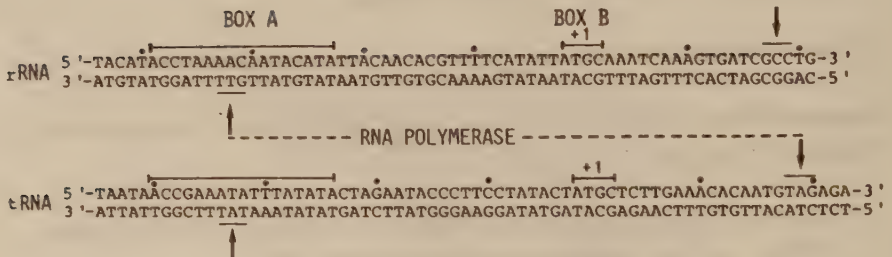


Abb. 21: Nukleotidsequenz des Bindungsbereichs der RNS-Polymerase aus *M. vanii* an einer rRNS- und einer tRNS-Transkriptionseinheit:

Die 5' und 3' Grenzen der Bindungsbereiche sind durch Pfeile markiert. Die Lage der beiden Primärstrukturmotive, die als Konsensus der 5' flankierenden Bereiche an Genen stabiler RNS abgeleitet wurden, ist über der Sequenz gekennzeichnet.

V. tRNS-Gene und ihre Organisation in dem thermophilen Archaeobakterium *Thermoproteus tenax*

Wie bereits erwähnt, lassen sich Archaeobakterien in zwei phylogenetisch weit auseinanderstehende Gruppen aufteilen, in die der methanogenen/halophilen und in die der thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterien. Um unsere Analysen auch auf diese zweite Gruppe der Archaeobakterien zu erweitern, wurden Gene stabiler RNS des schwefelabhängigen Archaeobakteriums *Thermoproteus tenax* untersucht.

1. Klonierung und Charakterisierung von tRNS-Genen aus *Thermoproteus tenax*

Die Klonierung und Sequenzierung von tRNS-Genen aus *T. tenax* erfolgte analog der für *M. vannielii* beschriebenen Prozedur. Chromosomale DNS von *T. tenax* wurde mit einem der Restriktionsenzyme PstI, BamHI oder SalI geschnitten und in den Vektor pUC19 kloniert. Rekombinante *E. coli* Klone wurden mit Hilfe von Koloniehybridisierung (Grunstein und Hogness, 1975) mit 5'-³²PO₄-markierter Gesamt-tRNS aus *T. tenax* auf das Vorhandensein von tRNS-Genen dieses Organismus getestet. Die gereinigte Plasmid-DNS positiv reagierender Klone wurde in "Southern Blot"-Experimenten (Southern, 1975) mit radioaktiv markierter tRNS analysiert (nicht gezeigt). Die Position der tRNS-Gene in vier der erhaltenen Klone konnte so durch Restriktion und Hybridisierung eingeengt werden (siehe Abb. 22). Die DNS-Sequenz dieser Bereiche wurde nach der chemischen Methode (Maxam und Gilbert, 1980) bestimmt. Die Restriktionskarte und die Sequenzierstrategie sind in Abbildung 22 gezeigt.

- siehe nachfolgend Abbildung 22 -

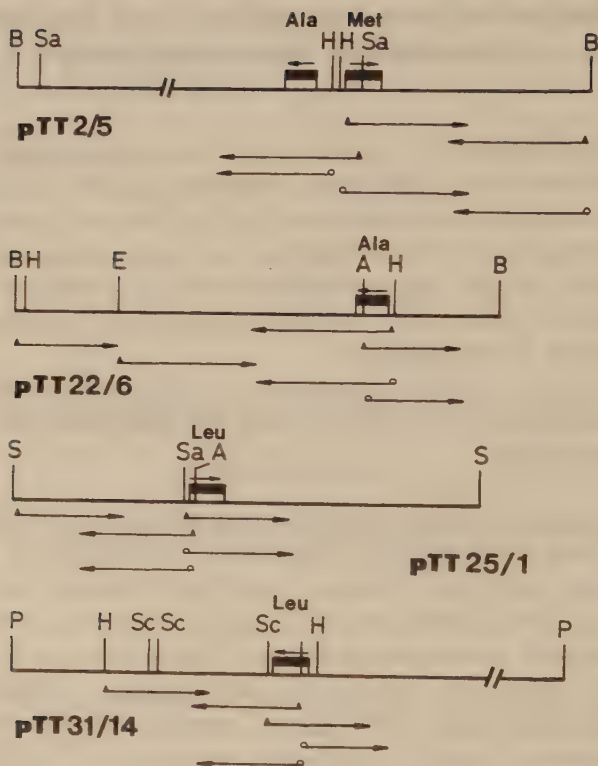


Abb. 22: Restriktionskarten der aus *T. tenax* klonierten tRNA-Gene und ihre Sequenzierungsstrategie: Die BamHI-Fragmente von pTT2/5 und pTT22/6 und das PstI-Fragment von pTT31/14 wurden direkt aus genomischer DNS von *Thermoproteus* kloniert, während das SalI-Fragment von pTT25/1 aus einem 4,4 kb HindIII-Fragment des Klons pTT25 subkloniert wurde. Umrahmte Bereiche stellen die tRNA-kodierenden Regionen dar, ihre Aminosäurespezifität ist angegeben. Die Pfeile beschreiben die Sequenzierungsstrategie; 3' markierte Restriktionsschnittstellen werden durch Halbkreise, 5' markierte Restriktionsschnittstellen durch Dreiecke gekennzeichnet. **Abkürzungen der Restriktionsschnittstellen:** A (AvaI), B (BamHI), E (EcoRI), H (HindIII), P (PstI), S (SalI), Sa (SauI), Sc (SacI).

2. Identifizierung von tRNS-Genen innerhalb des sequenzierten Bereichs

Insgesamt fünf tRNS-Gene konnten auf den sequenzierten DNS-Fragmenten lokalisiert werden (Abb. 23a-d). Die beiden tRNS-Gene des Plasmids pTT2/5 sind eng benachbart, besitzen jedoch eine unterschiedliche transkriptionelle Orientierung: tRNS-Gene, die mit anderen ein Operon bilden, wurden nicht gefunden. Keines der T. tenax tRNS-Gene kodiert für das 3' terminale CCA-Ende. Wie die ribosomale RNS dieses Organismus (Leinfelder et al., 1985; Kjems et al., 1987), weisen die tRNS-Sequenzen ein starkes Übergewicht an G-C-Basenpaaren innerhalb der helikalen Bereiche der Sekundärstruktur auf, eine Eigenschaft, die möglicherweise zur Thermostabilität dieser Strukturen in dem hochthermophilen Organismus (Wachstumsoptimum 88°C) beiträgt.

Die erwarteten Transkripte der fünf tRNS-Gene sind in Abbildung 24 zu sehen. Nach ihrer Anticodonsequenz sind sie für folgende Aminosäuren spezifisch: Plasmid pTT2/5, tRNS^{Met} (CAT) und tRNS^{Ala} (CGC); Plasmid pTT22/6, tRNS^{Ala} (TGC); Plasmid pTT25/1, tRNS^{Leu} (CAA); Plasmid pTT31/14, tRNS^{Leu} (CAG). Der kodierende Bereich in vier der fünf tRNS-Gene scheint durch Intronsequenzen unterbrochen zu sein (Abb. 24). Gleiches wurde für tRNS-Gene aus dem schwefelabhängigen Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus* und aus dem halophilen Archaeobakterium *Halobacterium volcanii* beschrieben (Kaine et al., 1983; Kaine, 1987; Daniels et al., 1985). Obschon es keinen direkten Beweis gibt, daß diese Strukturen biologisch aktiv sind, sprechen doch eine ganze Reihe von Tatsachen für diese Ansicht:

- Die tRNS-Gene enthalten alle in tRNS-Molekülen konservierten Nukleotide an exakt der erwarteten Position (siehe Sprinzl et al., 1985a,b). Die Transkripte können (mit Ausnahme der Intronsequenz) in die für tRNS typische Kleeblattstruktur gefalten werden.

10 20 30 40 50 60 70 80
Av **S** **Ala** **E**
 AGCTGTCAATAAAACCTTTCTGATGGAGCGGGCCGGGATTGGAACCCGGGATCTCCGGCGGGCGAGGCTACGCGGCACAGC
 TGCAGAGTTATTTTGAAGACTACCTGGGCGGCGCTAAAGCTTGGGCGCTAGAGGGGCGCGCTCCGATGCGCGCTGTCTG

90 100 110 120 130 140 150 160
Su **S1** **p** **Met**
 CTGGGGTCTCTTCCGCTAGACTACCGGCTCGAGGCTACTTACTCACCAGTTTAAATTTTTCGCTAGAGCGCCACGCGG
 GACCCGCGAGGAAGCGATCTGATGGCGCGGCTCGCATGAAATGATGGCTAAATTTTAAATAAGGATCTCGCGGCTCGCGC

170 180 190 200 210 220 230 240
P **H** **S1** **Met**
 ACAAAAGCTTTTAAATTCGGGCAAGCTTAGACCTAGCGGGGTAGGCCAGCTAGGTAGGCGCGGGGCTCATTAAGGGC
 TGTCTTGGAAAAATTTAAGCGGCTTTCGAACTGGGATCGCCCCCATCGGCTCGATCCAACCGGGCGCCCGAGTATTCGCG

250 260 270 280 290 300 310 320
Sa **S**
 CTAAGGCGCGAGGATCCCGGAGGTCCTCGGCTTCAAAATCCCGGCGCGGCTATCTGTCACACCGGGCTCTCTACAT
 GATTCGGGCTCTCTCGGCTCCAGGCTCAAGCTTTCAGGGCGGGGCGATACAGCTGTGGCGGAGGATGTA

10 20 30 40 50 60 70 80
 CAGTGGGAGGTATCGGCTATGGCGGGCCCTCTCGGATCGAGTTCCTCGCAGCTATGCTCTCTCGATGGCAGAAAGGCT
 GTCACTCTCATAGCGGTAAAGCGCGGGGAGCTCTAGCTCAAGGAGGCTCGGATACGGAGAGAGCTACCGCTCTCCCGA

90 100 110 120 130 140 150 160
 GTCTTCTCAGAGTGTTCGAGAAAGCGCGGAGGAGTGGGAACCGCGCAGGTAGGAGTTGAAGGGAGGGGATGAGCT
 CACAAGCAGTGTCAAGAATCTTTCGGGCTCTCTCAACCTTGGGGCGGTCACATCTCGAACTTCCCTCTCGCTACTCGA

170 180 190 200 210 220 230 240
p **Su**
 CCGAGGGCTTAAATTTTAAATACTCTGTATATAACAGTTTGGCGGCTAGTCTAGGGGAAGGACGCGCGAGGCTGTGC
 GCTCTCCGAATTTTGAATTTTATAGCAGTATATTGCTCAACCCGCGCATCAGATCGCTCTCTCGGGTCCGACAGC

250 260 270 280 290 300 310 320
Ala **Met**
 CGGCTAGGCTTTCGGCGCGGAGATCCCGGGTTCGAAATCCCGCGCGGCTCACTCTTTATAGACATATATTTATCAGTGC
 GCGCATCCGGAACCGCGGCTCTAGGGGCTCAAGCTTAGGGGCGGGCAGGCTGGAGAAATATCTGTATATAAATAGTCAGC

10 20 30 40 50 60 70 80
 CATCGAGGTTGTAAAGAGGAGCTGAGCGGGAAGGGCAATTGATCTTTCACCGCTCGACAGATACATACAGAGGTCGTTG
 GTAGCTCCAACTTTTTCCTGAGTCTGGGCTTCCGTAAGTAGGAAGTGGCGAGCTGTCTATGTATGTCTCCAGCAAC

90 100 110 120 130 140 150 160
 AAAAGCTTGAACAATTAAGTTGGAGCTGATCGAACAGGGGCTGAAAAATTTTAAATGAGCAGTTTATATCAGAGAGC
 TTTTCGAATCTTGTAAATTAACCTCGAGCTAGCTGTCTCCCGAGCTTTTAAATTTGACTCGTCAAAATATAGTCTCTGC

170 180 190 200 210 220 230 240
A **Leu**
 GCGGGGCTCTCGAGCAGGCTCAAGGGGCGGGTTCACAGCGATGCTGGGCCAGAGGTCCTGTGGCGTAGGCTTCGCT
 CGCCCCAGGGCTCGGTCAGTTTCGCGCTCCAACTGTCTGTACGACCGGGTCTCCAGGGACACCGCATCCGAGCGCA

250 260 270 280 290 300 310 320
Sc
 GGGTCAAAATCCGACCGCGGCTCTCTCTTTCGAGCTCTCTGACTCTCTAGTGCCCTCGAG
 CCAAGTTTGGGGTGGGGGCTTAAGAGAAGGCTCGAGAGCTGAGAAGATCAAGGGGACTC

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TTAGAGAGGCGCCGTGTAGCGATGCTGAGGCTTTAGTGGGCCATAAAATATACTCAAACAGATGCTGGATCTGCCCAAT
AATCTCTCCGCGGCACATCGCTACGACTCCGAAATCACCCGGTATTTATATGAGTTTGTCTACGACCTAGACGGGGTTA

      90      100     110     120     130     140     150     160
TGTGGCTCAGTATATTGGGAGGGTAGCCATTGGCGCGGCCTGCCAACTACAGTAAAGGAGGCATTACAGAGGGATGTGCG
ACACCGAGTCATATAACCCCTCCCATCGGTAACCGCGCCGACGCTTGATGTCAATTCCTCCGTAATGTCTCCCTACACGC

      170  P 180      190      200      210      A 220      230  Leu 240
TTGCGAGAAACATTTTAATCCTGAGGAGAAAATACTGGACAGGCGGGGGTGCCCGAGCCAGGTCAAAGGGGCAGGGGCTC
AACGCTCTTTTGAAAAATTAGGACTCCTCTTTTATGACCTGTCTGCCCCCACGGGCTCGGTCCAGTTTCCCGTCCCGAG

      250      260      270  Hf 280      290      300      310      320
AAGACCCCTGTGGCGTAGGCCTGCGTGGGTTCGAATCCCACCCCCCGCATACTATTCTCTCACTGGGTTCAAATTAGGGTT
TTCTGGGACACCGCATCCGGACGCACCCAAGCTTAGGGTGGGGGGCCTATGATAAGAGAGTGACCCAAGTTTAATCCCAA

```

Abb. 23: Sequenzen der tRNS kodierenden Regionen aus pTT2/5 (a), pTT22/6 (b), pTT25/1 (c) und pTT31/14(d):

Die kodierenden Bereiche sind umrandet, Introns in den tRNS-Genen durch unterbrochene Linien gekennzeichnet. Die Transkriptionsrichtung der Gene ist durch Pfeile angedeutet. Eine mögliche Promotorsequenz ist in der Sequenz markiert (P).

Abkürzungen der Restriktionsschnittstellen: A (AvaI), Av (AvaII), D (DdeI), F (Fnu4HI), H (HindIII), Hf (HinfI), N (NotI), S (SmaI), Sa (SauI), Sc (SacI), Su (Sau96I).

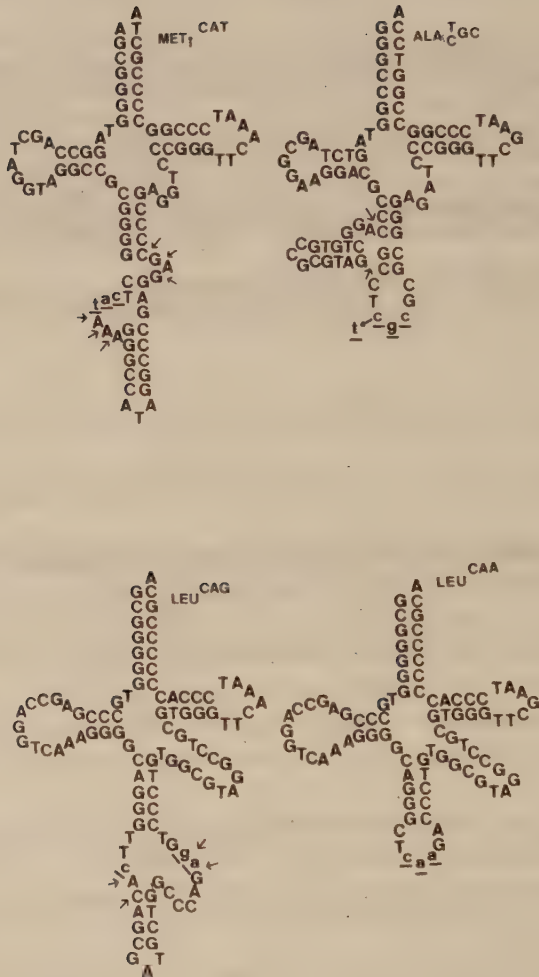


Abb. 24: Kleeblattstrukturen der Transkripte der tRNS-Gene aus *T. tenax*: Die Anticodonsequenzen sind unterstrichen. Pfeile kennzeichnen mögliche Prozessierungsstellen der Intronbereiche.

- Das trNS^{Met} -Gen besitzt 80 % Sequenzähnlichkeit mit der Methionin-Initiator-tRNS aus dem verwandten Archaeobakterium *Sulfolobus* und alle Charakteristika einer archaeobakteriellen Initiator-tRNS (Kuchino et al., 1982). Im Detail sind das: ein terminales A_1-T_{72} -Basenpaar (universell in eukaryontischen und archaeobakteriellen Initiator-tRNS), die Basen A_{37} und A_{57} und die drei terminalen G-C Paarungen des Anticodonarms. Die Base T_{20} ist charakteristisch für eubakterielle Methionin-Initiator-tRNS.
- Eine sehr große Ähnlichkeit besteht zwischen dem trNS^{Leu} CAG-Gen und dem gleichen Gen von *S. solfataricus* (Kaine et al., 1983): 92 % der Nukleotide des kodierenden Bereiches sind konserviert. Beide Gene enthalten Introns. Die trNS^{Leu} -Gene aus *T. tenax* gehören wie alle trNS^{Leu} -Spezies zur Klasse II der tRNS, d.h. sie besitzen einen langen Extraarm.
- Die beiden trNS^{Ala} -Gene unterscheiden sich nur in ihrer Anticodonsequenz. Diese Konservierung ihrer Primärstruktur stützt die Annahme, daß sie für funktionelle Produkte kodieren.
- Hybridisierungen wurden durchgeführt mit fragmentierter chromosomaler DNS aus *Thermoproteus* und internen tRNS-Genfragmenten als Sonde, unter Bedingungen (70°C , $4 \times \text{SSPE}$), die nicht zwischen tRNS-Genen mit Introns und äquivalenten Genen ohne Introns diskriminierten (trNS^{Leu} (CAG) versus trNS^{Leu} (CAA) in Abb. 25c). Die Resultate zeigen, daß die betreffenden tRNS-Gene als Einzelkopien im *T. tenax* Genom vorliegen (Abb. 25). Da gleichzeitig die Klonierungsprozedur (siehe oben) nachwies, daß sich gleiche Sequenzen in der Gesamt-tRNS-Fraktion dieses Organismus befinden, kann dies als ein weiteres Indiz für ihre biologische Aktivität aufgefaßt werden.

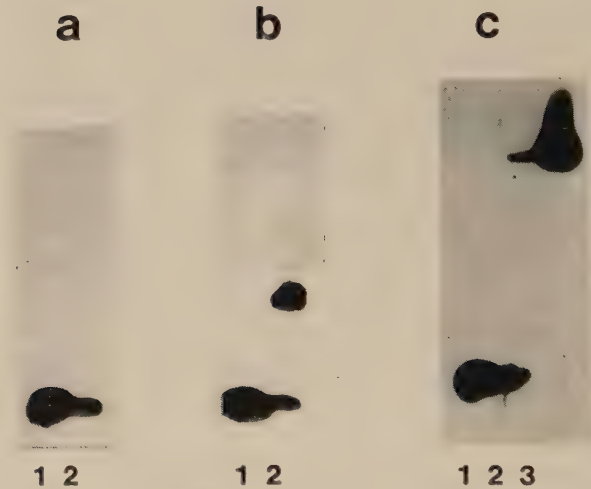


Abb. 25: Autoradiogramm der Hybridisierung genomischer DNS aus *T. tenax* mit DNS-Fragmenten der klonierten tRNS-Gene:

- a) Chromosomale DNS (Spur 2) und DNS des Plasmids pTT2/5 (Spur 1) wurden mit BamHI geschnitten und mit einem HindIII-SmaI-Fragment des tRNS^{Met}-Gens aus pTT2/5 (siehe Abb. 23a) hybridisiert.
- b) Wie in a), nur daß die Hybridisierung mit einem AvaII-Sau96I-Fragment des tRNS^{Ala}-Gens aus pTT22/6 (siehe Abb. 23b) durchgeführt wurde.
- c) Chromosomale DNS (Spur 2) und DNS der Plasmide pTT25 (Spur 1) und pTT31/14 (Spur 3) wurden mit HindIII geschnitten und mit einem AvaI-HinfI-Fragment des tRNS^{Leu}-Gens aus pTT25/1 (siehe Abb. 23c) hybridisiert.

3. Bestimmung der Lage des Introns in zwei tRNS^{Ala} - Genen mittels S1-Kartierung und "Primer-Extension" Analyse

Die aus der Sequenz abgeleitete Lokalisation der Intronsequenzen in den tRNS^{Ala}-Genen innerhalb des Anticodonarms 5' des Anticodons ist sehr ungewöhnlich. Um diese Lage zu beweisen, wurde S1-Kartierung des 3' Endes der Intronsequenz durchgeführt. Eine AvaII-Restriktionsschnittstelle am 3' Ende der tRNS kodierenden Sequenz wurde dazu mit $^{32}\text{PO}_4$ 5' markiert (Abb. 26a). Das nach EcoRI-Schnitt resultierende EcoRI-AvaII-Fragment (162 Basenpaare) mit der vollständigen tRNS-Gensequenz wurde mit Gesamt-tRNS aus *Thermoproteus* hybridisiert und mit Nuklease S1 bei 37°C bzw. 20°C abgebaut. Das Ergebnis ist in Abbildung 26b gezeigt.

Die S1-Kartierung bestätigt die aus Sequenzdaten abgeleitete Lage des Introns, eine Bestimmung auf eine Genauigkeit von einer Base konnte jedoch nicht erreicht werden. Wurde der S1-Abbau bei 20°C durchgeführt, einer Temperatur, bei der die Reaktion der Nuklease S1 an internen ungepaarten Regionen teilweise unterdrückt wird, entsteht ein weiteres und längeres geschütztes DNS-Fragment, das dem 5' Ende der reifen tRNS entspricht. Dies zeigt, daß Sequenzen, die der reifen tRNS^{Ala} entsprechen, in der Gesamt-tRNS von *Thermoproteus* existieren.

Um die exakte Lage des Introns zu bestimmen, wurden zusätzlich "Primer-Extension"-Analysen durchgeführt. Mittels eines Oligonukleotid-Primers, der komplementär zu 23 Basen des 3' Endes der tRNS^{Ala} war, wurden cDNS-Kopien der tRNS^{Ala} aus Gesamt-tRNS von *T. tenax* synthetisiert. Die cDNS-Moleküle wurden gelelektrophoretisch gereinigt und ihre Sequenz bestimmt. Abbildung 27 zeigt den kritischen Ausschnitt der Sequenz. Die Sequenz der reifen tRNS^{Ala} beweist, daß das Spleißen des Introns tatsächlich an den in Abbildung 24 bezeichneten Nukleotiden stattfindet.

VI. Kartierung des Transkriptionsinitiations-Bereiches bei Genen stabiler RNS in *Thermoproteus tenax*

Um die Transkriptionsstartbereiche der Gene stabiler RNS bei einem Vertreter der schwefelabhängigen Archaeobakterien, *Thermoproteus tenax*, mit denen des methanogenen Archaeobakteriums *Methanococcus vanniellii* vergleichen zu können, wurden Nuklease S1-Kartierungen durchgeführt.

1. Kartierung des Transkriptionsstarts einer rRNS-Transkriptionseinheit und zweier tRNS-Gene

Um die Startstelle der Transkription in dem 16S-23S rRNS-Operon (Leinfelder et al., 1985) von *T. tenax* zu bestimmen, wurde ein 328 Basenpaar NotI-DdeI DNS-Fragment an der NotI-Schnittstelle nahe dem 5' Ende des 16S rRNS-Gens radioaktiv 5' markiert (Abb. 28a). Das Fragment wurde denaturiert, an Gesamt-RNS aus *T. tenax* bei einer Temperatur von 58°C hybridisiert und mit Nuklease S1 abgebaut. Wie in Abbildung 28a gezeigt, kartiert das 5' Ende des längsten, durch RNS geschützten DNS-Fragmentes bei einem G 168 Basenpaare 5' zur markierten NotI-Stelle. Das gleiche Ergebnis wurde mit einem 610 bp XbaI-AvaII Restriktionsfragment (Abb. 28a) des rRNS-Operons erhalten (nicht gezeigt).

S1-Kartierungen wurden ebenfalls mit den beiden divergent orientierten tRNS-Genen des Plasmids pTT2/5 durchgeführt. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen 5' markiert, die innerhalb der Intronsequenzen lagen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß in der S1-Kartierung nur tRNS-Verläufermoleküle detektiert werden, die reifen tRNS-Moleküle können die radioaktive Markierung nicht vor Abbau durch die einzelstrang-spezifische Nuklease S1 schützen. In Abbildung 28 b,c sind die Strategien und die Ergebnisse dieser Versuche mit dem tRNS^{Met}- und dem tRNS^{Ala}-Gen aus pTT2/5 dargestellt. Die Hybridisierungstemperatur war in beiden Fällen 54°C.

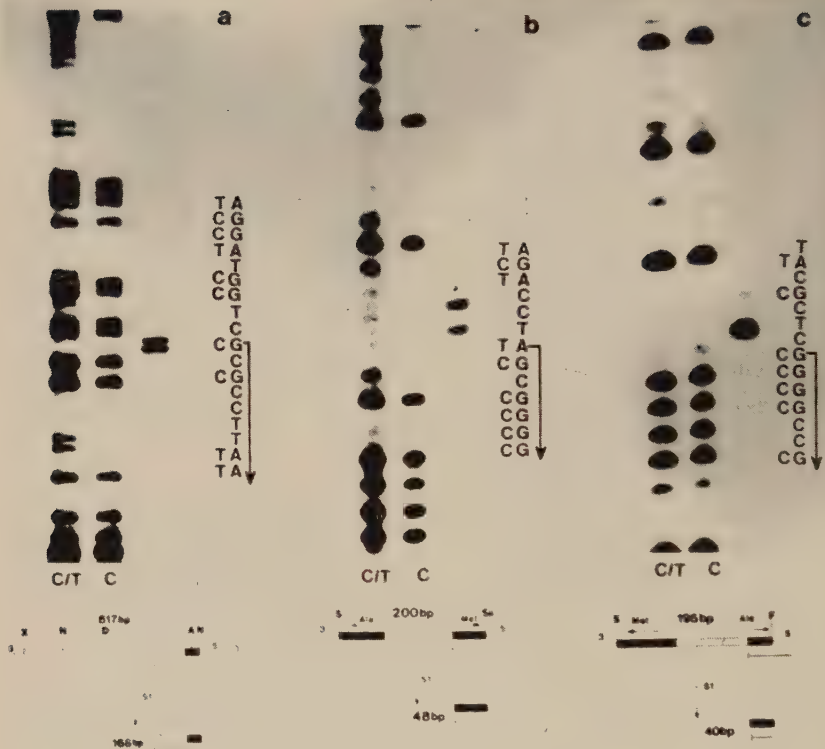


Abb. 28: Nuklease S1-Kartierung der Startstelle der Transkription an einem rRNS-Operon (a), einem tRNS^{Met}-Gen und einem tRNS-Gen aus *T. tenax*:

a) Ein 328 Basenpaar DdeI-NotI-Fragment von pTT1 (Leinfelder et al., 1985) wurde an der NotI-Schnittstelle 5' markiert, mit Gesamt-RNS aus *T. tenax* hybridisiert und mit Nuklease S1 abgebaut. Die Größe des längsten geschützten DNS-Fragments wurde durch Vergleich mit der Sequenzleiter des unbehandelten DNS-Fragments bestimmt.

b) Autoradiogramm des S1-resistenten RNS-DNS-Hybrids des tRNS^{Met}-Gens aus pTT2/5. Ein 200 Basenpaar SmaI-SauI-Fragment wurde an der SauI-Schnittstelle innerhalb des Introns der tRNS^{Met}-Gensequenz 5' markiert, mit Gesamt-RNS aus *T. tenax* hybridisiert und mit Nuklease abgebaut.

c) Autoradiogramm des S1 resistenten RNS-DNS-Hybrids des tRNS^{Ala}-Gens aus pTT2/5. Das verwandte SmaI-Fnu4HI-Fragment war an der Fnu4HI-Schnittstelle im Intron des tRNS^{Ala}-Gens 5' markiert.

Die Schnittstellen der Restriktionsnukleasen wurden folgendermaßen abgekürzt: A (AvaI), D (DdeI), F (Fnu4HI), N (NotI), S (SmaI), Sa (SauI), X (XhoI).

Das 5' Ende des einzigen nachweisbaren geschützten DNS-Fragments des tRNA^{Met}-Gens kartiert bei einem A, 48 Basenpaare vor der markierten Schnittstelle. Bei dem vergleichbaren Experiment mit dem tRNA^{Ala}-Gen liegt der Startpunkt des tRNA-Vorläufermoleküls bei einem G, in Position 40 5' zur Schnittstelle. Im Falle des tRNA^{Met}-Gens stimmt diese Kartierungsposition des Vorläufermoleküls mit dem 5' Ende der kodierenden Sequenz überein, bei dem tRNA^{Ala}-Gen liegt das 5' Ende ein Nukleotid "stromauf" der kodierenden Region.

2. Konservierte DNS-Sequenzen im Bereich der Transkriptionsinitiation

Ein Vergleich der 5' flankierenden Bereiche der sechs analysierten Transkriptionseinheiten für RNS-Gene in *T. tenax* ist in Abbildung 29 dargestellt.



Abb. 29: Vergleich der 5' flankierenden Bereiche der Gene stabiler RNS aus *T. tenax*: Kodierende Regionen sind umrandet, die Startpunkte der Transkription über der Sequenz markiert. Eine konservierte AT-reiche Sequenz der 5' flankierenden Bereiche ist unterstrichen.

Die Initiationsstellen der Transkription sind durch Pfeile markiert. Folgende Merkmale dieser mutmaßlichen Promotorregionen aus *T. tenax* erscheinen im Vergleich zu denen von *M. vannielii* erwähnenswert:

Eine "Box" B-Sequenz, äquivalent zu der in *Methanococcus*, ist nicht festzustellen. In einem Abstand, der exakt dem zwischen Transkriptionsstart und der Box A-Sequenz in *Methanococcus* entspricht, liegt bei jeder der untersuchten Transkriptionseinheiten von *Thermoproteus* ein auffälliger AT-Basenpaarblock, der 13 bis 16 AT-Paarungen umfaßt. In pTT2/5 ist ein solcher AT-Block im intercistronischen Spacer der divergent orientierten tRNS-Gene zweifach vorhanden (Abb. 23a). Dieses konservierte AT-Motiv hat Sequenzähnlichkeit mit dem von der RNS-Polymerase geschützten AT-reichen Bereich der "Box" A des *Methanococcus* Promotors.

VII. Versuche zur Prozessierung der tRNS-Introns

Die Lage des Introns in den tRNS-Genen aus *T. tenax* ist, wie bereits beschrieben, ungewöhnlich und weicht von der für eukaryontische tRNS gefundenen ab. Ein vom Mechanismus des Intron-Spleißens in Eukaryonten verschiedener Modus könnte deswegen in diesem thermophilen Archaeobakterium verwirklicht sein. Als erster Schritt einer Analyse hierzu wurde versucht, ein in vitro Prozessierungssystem für tRNS aus *T. tenax* aufzustellen.

1. In vitro Transkription von tRNS-Genen aus *Thermoproteus*

Eine erste Voraussetzung zum Erarbeiten eines in vitro Prozessierungssystems ist die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an tRNS-Vorläufermolekülen als Substrat. Die einfachste Möglichkeit, zu ungespleißten tRNS-Transkripten zu kommen, ist eine in vitro Transkription der entsprechenden tRNS-kodierenden Einheiten unter Kontrolle des SP6-Promotors mit Hilfe der spezifischen Polymerase aus diesem Virus (Melton et al., 1981). Zu diesem Zweck wurde das tRNS^{Met}-Gen und eine tRNS^{Ala}-Sequenz so in den Plasmidvektor pJB76 kloniert, daß sie über den SP6-Promotor exprimiert werden können (Abb. 30). Dieser Vektor enthält neben dem SP6-Promotor auch noch den T7-Promotor in entgegengesetzter transkriptioneller Orientierung und den Replikationsursprung des Phagen f1, mit dessen Hilfe einzelsträngige Vektor-DNS gewonnen werden kann.

Abbildung 30 zeigt die Konstruktion der rekombinanten Vektoren. Die Klonierung sollte möglichst nur den eigentlichen tRNS-kodierenden Bereich umfassen, um zu verhindern, daß die Transkriptionsprodukte große "unphysiologische" 3' und 5' flankierende Bereiche besitzen. Nahe benachbart zum 5' und 3' Ende der kodierenden Region des tRNS^{Met}-Gens liegen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindIII beziehungsweise HgiAI (Abb. 23a). Eine Restriktion mit diesen beiden Enzymen liefert ein 111 Basenpaar DNS-Fragment mit dem tRNS^{Met} kodierenden Bereich. Die beiden überhängenden Restriktionsstellen wurden

durch die einzelstrangspezifische "Mung bean" Nuklease in glatte DNS-Enden überführt und das DNS-Fragment wurde in die SmaI-Schnittstelle des Plasmidvektors kloniert. Der rekombinante Klon pJBT2 wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach Linearisierung dieses Plasmids mit dem Restriktionsenzym BamHI und Transkription mit Hilfe der SP6-Polymerase entsteht ein 129 Basenpaar langes in vitro Transkript. Diese RNS enthält die tRNA^{Met}-Sequenz und zusätzlich 26 Basen am 5' Ende bzw. 9 Basen am 3' Ende (Abb. 30).

Wegen der ungewöhnlichen Lage des Introns waren Prozessierungsanalysen eines der tRNA^{Ala}-Transkripte wünschenswert. Weder bei dem tRNA^{Ala}-Gen aus pTT2/5 noch bei dem tRNA^{Ala}-Gen aus pTT22/6 sind für eine Klonierung in pBJ76 geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden (Abb. 23a,b). Deshalb wurde ein synthetisches tRNA^{Ala}-Gen mit einer flankierenden EcoRI- und SalI-Restriktionsschnittstelle aus Oligonukleotiden hergestellt (Abb. 30); die dazu notwendigen Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Dr. Mertz (Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Nach Schnitt mit EcoRI und SalI wurde das Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert. Das weiterverwendete rekombinante Plasmid pJBT22, und damit die Sequenz des in vitro synthetisierten tRNA^{Ala}-Gens, wurden durch Sequenzierung überprüft. Das nach Linearisierung von pJBT22 mit dem Restriktionsenzym SalI und Transkription mit Hilfe der SP6-Polymerase erhaltene "run-off" Transkript hat eine Länge von 94 Basenpaare. Es enthält neben der tRNA^{Ala}-Sequenz 5' die fünf Basen der EcoRI- und 3' die fünf Basen der SalI-Restriktionsschnittstelle.

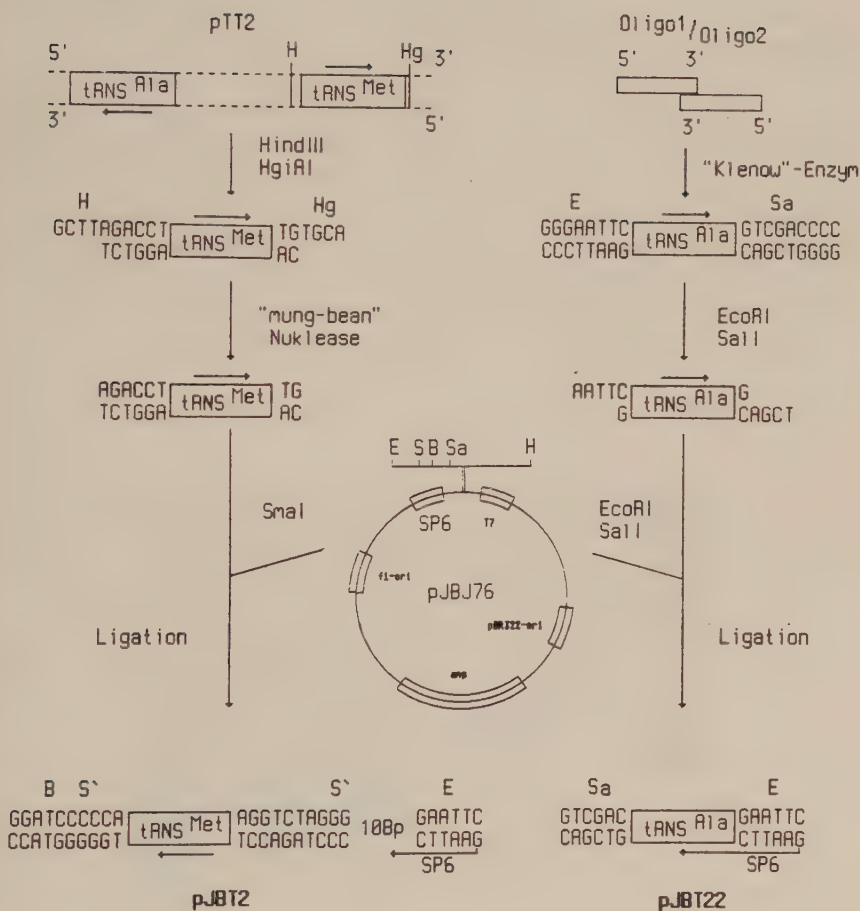


Abb.30: Konstruktion der rekombinanten Plasmide pJBT2 und pJBT22:

Das tRNA^{Ala}-Gen von pJBT22 wurde aus zwei Oligonukleotiden in vitro synthetisiert. Die Transkriptionsrichtung der tRNA-Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. Das Startnukleotid der SP6-Polymerase in den Konstrukten ist in der Sequenz markiert.

Abkürzungen der Restriktionsschnittstellen: B (BamHI), E (EcoRI), H (HindIII), Hg (HgiAI), S (SmaI), Sa (SalI).

2. Prozessierungsversuche der in vitro erzeugten tRNS-Vorläufermoleküle

In vitro Transkription des BamHI-ClaI-Fragments aus pJBT2 und des SalI-ClaI-Fragments aus pJBT22 mit Hilfe von SP6-Polymerase resultiert in Transkripten der erwarteten Länge von 129 und 94 Basen (Abb. 31, Spur 2, 3). Inkubation dieser Transkripte für 20 min mit S100 Fraktion aus *T. tenax*, unter den in "Material und Methoden" angegebenen Bedingungen, führt in beiden Fällen zu einem verkürzten RNS-Fragment (Abb. 31, Spur 4, 5).

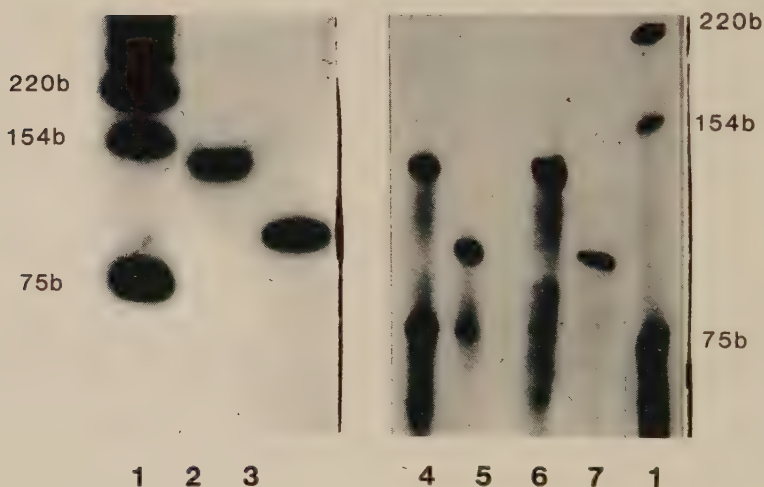


Abb. 31: In vitro Prozessierungsversuche der Introns in tRNS-Vorläufermolekülen aus *T. tenax*: Spur 1: Längenstandard pBR322 x HinfI; Spur 2: Transkript des tRNS^{Met}-Gens aus pJBT2; Spur 3: Transkript des tRNS^{Ala}-Gens aus pJBT22; Spur 4: Transkript des tRNS^{Met}-Gens nach 20 min Inkubation mit S100-Extrakt bei 80°C; Spur 5: Transkript des tRNS^{Ala}-Gens nach Inkubation mit S100-Extrakt; Spuren 6 und 7: Kontrollen: Transkripte des tRNS^{Met}- bzw. tRNS^{Ala}-Gens nach Inkubation bei 80°C ohne S100-Extrakt.

Die anhand des Längenstandards bestimmten Größen stimmen mit denen überein, die für eine reife tRNA^{Met} beziehungsweise tRNA^{Ala} ohne 5' und 3' flankierende Bereiche, und ohne Intronsequenz, zu erwarten wären. Die verkürzten RNS-Moleküle treten nicht auf, wenn dem Ansatz keine S100-Fraktion zugegeben wurde (Abb. 31, Spur 6, 7). Da im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Analysen durchgeführt wurden, kann zur Zeit noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei diesen verkürzten RNS-Fragmenten tatsächlich um prozessierte tRNA handelt, oder sie durch unspezifische RNasen des Thermoproteus S100-Extraktes zufällig auf diese Größe abgebaute RNS-Bruchstücke darstellen.

VIII. Charakterisierung einer Restriktionsendonuklease aus dem extrem thermophilen Organismus *Thermoproteus tenax*

Während der geschilderten Prozessierungsversuche fiel auf, daß die im Ansatz vorhandenen DNS-Fragmente aus den Vektoren pJBT2 und pJBT22 spezifisch in zwei Hälften gespalten wurden. Das dafür verantwortliche Enzym, eine mutmaßliche Restriktionsendonuklease aus *Thermoproteus*, sollte vorläufig charakterisiert werden.

1. Bedingung der Reaktion

Die "zufälligen" Restriktionen des BamHI-ClaI-Fragments aus pJBT2 und des Sall-ClaI-Fragments aus pJBT22 wurden unter den Bedingungen der Prozessierungsanalysen gefunden. Das bedeutet, daß der Ansatz mit 50 mM Tris/Cl pH 8.0 gepuffert war und 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP und 3 μl S100-Extrakt (3 μg Protein) aus *Thermoproteus* enthielt. Reaktionstemperatur war 80°C. Analysen zeigten, daß die Aktivität von extern zugegebenem ATP unabhängig war. Auch eine Präinkubation der S100-Fraktion für 20 min bei 80°C, eine Maßnahme, die den internen ATP-Spiegel durch Hydrolyse erniedrigen sollte, war ohne Einfluß auf die Enzymreaktion. ATP-unabhängige Restriktionsreaktionen sind für den sogenannten Typ II der Restriktionsenzyme charakteristisch (siehe Kessler und Höltke, 1986). Diese Enzyme sind außerdem dadurch gekennzeichnet, daß sie palindrome Sequenzen der DNS erkennen und in ihnen schneiden.

Interessant war die Bestimmung des Temperaturspektrums der Spaltungsreaktion. Dazu wurde das BamHI-ClaI-Fragment aus pJBT2 an der BamHI-Schnittstelle 3' markiert. Nur durch radioaktive Markierung war es möglich, die verkürzten Fragmente vor dem Hintergrund der Nukleinsäuren des S100 Extrakts durch Autoradiographie sicher zu identifizieren. Äquivalente der markierten Fragmente wurden dazu mit 3 μl S100-Extrakt bei Reaktionstemperaturen von 40°C bis 100°C 1 h inkubiert. Vor

Zugabe der Enzymfraktion wurden die Ansätze 5 min bei der betreffenden Temperatur präinkubiert. Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung wurden durch Überschichten mit dünnflüssigem Paraffin (Merck) oder durch wiederholtes kurzes Abzentrifugieren vermieden. Die Analyse der Reaktionsprodukte ist in Abbildung 32^f gezeigt.

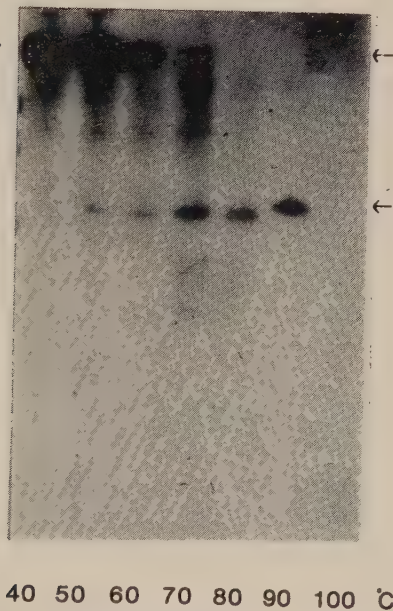


Abb. 32: Temperaturspektrum der Reaktion des Restriktionsenzym aus *T. tenax*: Das BamHI-ClaI-Fragment aus pJBT2 wurde an der BamHI-Schnittstelle 3' markiert und mit S100-Extrakt aus *T. tenax* unter den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Ausgangsfragmente und die durch Restriktionsschnitt verkürzten Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Es ist deutlich zu sehen, daß die größte Menge an verkürztem Fragment bei Temperaturen von 80°C und 90°C auftritt. Ob bei 100°C noch Enzymaktivität vorhanden ist, konnte nicht bestimmt werden, da bei dieser Temperatur das DNS-Fragment nach einstündiger Inkubation vollständig hydrolysiert war. Das Restriktionsenzym aus *Thermoproteus* besitzt demnach das sehr ungewöhnliche, aber an die Wachstumsbedingungen des Organismus angepaßte Temperaturoptimum von 80°C bis 90°C.

2. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die bestimmte Nukleotidsequenzen der DNS erkennen, und DNS an spezifischen Stellen schneiden. Für Typ II Restriktionsendonukleasen ist die Erkennungssequenz gleich der Schnittsequenz. Die Nukleotidsequenz der Erkennungsstelle und die Lage des Schnittes im Vergleich dazu, sollten für das mutmaßliche Restriktionsenzym aus *T. tenax* bestimmt werden.

Zu diesem Zweck wurde das *Sal*I-*Cla*I-Fragment aus pJBT22 an der *Sal*I-Schnittstelle 5' markiert und nach Maxam und Gilbert (1980) sequenziert. Ein Äquivalent des markierten Fragments wurde mit *Thermoproteus* S100-Extrakt behandelt. Das verkürzte Fragment wurde Seite an Seite mit der Sequenzleiter elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 33a). Der Vergleich der Sequenz mit der Fragmentgröße erlaubt die Bestimmung der 3' terminalen Nukleotide, die durch den Abbau mit dem Restriktionsenzym entstehen. Es zeigt sich, daß im Bereich des Schnittes, wie es für Typ II Restriktionsenzyme beschrieben ist, eine palindrome Sequenz 5'TGCAGCA3' vorhanden ist (Abb. 33a). Der innere Bereich dieser Sequenz deckt sich mit der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Fnu*4HI 5'GCNGC3' (Kessler und Höltke, 1986). Abbildung 33b zeigt das gleiche Experiment, nur wurde die *Sal*I-Restriktionsschnittstelle hier am 3' Ende markiert, so daß die 5' terminalen Nukleotide bestimmt wurden. Auch hier liegt der Schnitt innerhalb der oben erwähnten palindromen Sequenz, ist aber gegenüber dem 3' Ende um etwa drei Basen zu höherem

Molekulargewicht verschoben. Das Restriktionsenzym aus *Thermoproteus* schneidet damit die DNS so, daß 5' überhängende Enden erzeugt werden.

Um zu beweisen, daß die oben erwähnte Sequenz tatsächlich ganz oder zumindest teilweise die Erkennungs- und Schnittsequenz dieser Endonuklease ist, wurden verschiedene DNS bekannter Nukleotidsequenz mit *Thermoproteus* S100-Extrakt inkubiert. Diese Modellsubstrate sind in Abbildung 34 gezeigt. Es sind vier verschiedene Fragmente aus dem Plasmidvektor pBR322 (Peden, 1983), zwei Fragmente aus der DNS des Phagen M13 (Yanisch-Perron et al., 1985), sowie ein Fragment des Vektors pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985). Alle Fragmente wurden an einem Ende radioaktiv markiert (Abb. 34) und mit dem Restriktionsenzym aus *Thermoproteus* abgebaut. Das Autoradiogramm der Abbildung 33 zeigt einen Teil der verkürzten Fragmente. Der Vergleich der Länge der Fragmente mit den bekannten Sequenzen ergab, daß in jedem Fall der Schnitt im Bereich der palindromen Sequenz 5'GCAGC^{3'} bzw. 5'GCTGC^{3'} erfolgte. Im Gegensatz zu dem Restriktionsenzym *Fnu4HI* wird diese Sequenz nicht erkannt, wenn das zentrale Nukleotid ein G oder ein C ist (Abb. 34, Nr. 1, 2).

Die gezeigten Analysen beweisen, daß *T. tenax* eine sequenzspezifische Endonuklease, wahrscheinlich eine Restriktionsendonuklease des Typs II, mit der Erkennungsspezifität 5'GC^AGC^{3'} enthält. Der Schnitt an dieser Sequenz erfolgt so, daß drei Basen 5' überhängen. Die fünf Basen werden von dem Enzym auf DNS-Fragmenten völlig spezifisch bei einer Temperatur von 90°C erkannt und geschnitten. Nach Konvention wird das Enzym als *TtxI* bezeichnet (siehe Kessler und Höltke, 1986).

- siehe nachfolgend Abbildungen 33 und 34 -

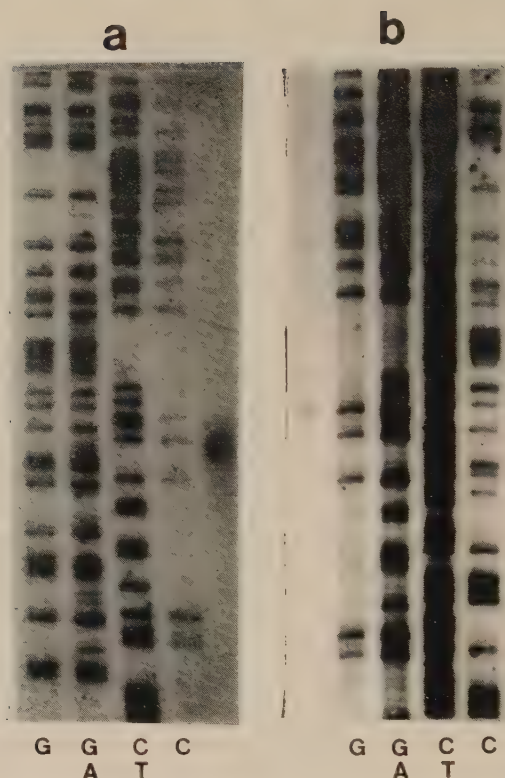


Abb. 33: Sequenz der Schnittstelle des Restriktionsenzymys aus T. tenax:

(a) Das BamHI-ClaI-Fragment aus pJBT2 wurde an der BamHI-Schnittstelle 5' markiert und mit dem Restriktionsenzym aus T. tenax abgebaut. Im Vergleich dazu sind die Sequenzreaktionen des unbehandelten DNS-Fragments gezeigt.

(b) Gleiches Experiment wie in (a) nur mit dem 3' markierten BamHI-ClaI-Fragment aus pJBT2.

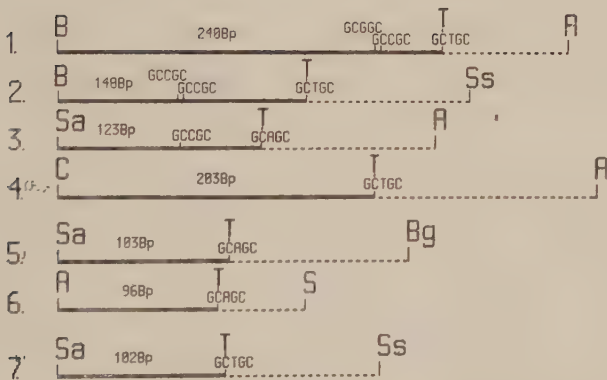
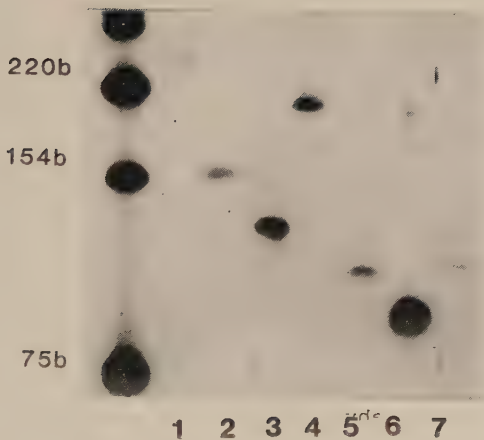


Abb. 34: Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease aus *T. tenax*. Bestimmung mit Hilfe verschiedener Modellsubstrate: Die DNS-Fragmente 1 bis 4 sind aus dem Plasmid pBR322, die Fragmente 5 und 6 aus der DNS des Phagen M13 und das Fragment 7 ist aus dem Plasmid pUC18. Diejenigen Restriktionsschnittstellen der Fragmente, die 3' radioaktiv markiert werden, sind in der Schemazeichnung jeweils auf der rechten Seite gezeigt. Die nach dem Autoradiogramm bestimmten Längen der durch das Restriktionsenzym aus *T. tenax* (T) verkürzten DNS-Fragmente und die daraus abgeleiteten Schnittsequenzen sind in der Zeichnung angegeben.

C. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele:

- es sollte ein Einblick in die Organisation und Struktur archaeobakterieller Gene erhalten werden,
- es sollten Signale der Transkription dieser Gene aufgeklärt werden.

Für beide Fragestellungen boten sich Gene stabiler RNS als Ausgangspunkt für Analysen an. Sie sind relativ leicht verfügbar, sie kodieren für universelle Zellkomponenten und zeigen für Eukaryonten beziehungsweise für Eubakterien charakteristische Eigenschaften. Für die Suche nach Transkriptionssignalen bieten sie den zusätzlichen Vorteil, daß sie einer einheitlichen Regulation unterliegen.

I. Organisation und Struktur der Gene stabiler RNS in *Methanococcus* und *Thermoproteus*

Tabelle 3 faßt charakteristische Merkmale der Organisation und Struktur der tRNS- und rRNS-Gene aus *Methanococcus* und *Thermoproteus* zusammen: *M. vannielii* wie auch *M. voltae* besitzen rRNS-Operonen "eubakteriellen" Typs, in denen 16S, 23S und 5S rRNS in einer Transkriptionseinheit liegen. Das gleiche Bild finden wir bei allen bisher analysierten Vertretern der Gruppe der methanogenen/halophilen Archaeobakterien (Neumann et al., 1983; Lechner et al., 1985; Hui und Dennis, 1985; Larsen et al., 1986; Ostergaard et al., 1987). Auch eine große Anzahl der tRNS-Gene aus *Methanococcus* ist in Operonstrukturen zusammengefaßt (Tab. 3).

Weiterhin besitzen sowohl *M. voltae* als auch *M. vannielii* zusätzliche 5S rRNS-Gene, die nicht in der Nachbarschaft von Genen ribosomaler RNS kartieren. Sie sind mit tRNS-Genen zu

Tabelle 3: Organisation und Struktur der Gene stabiler RNS in *M. vannielii*, *M. voltae* und *T. tenax*

Organisation der	<i>M. vannielii</i>	<i>M. voltae</i>	<i>T. tenax</i>
16S rRNS- und 23S rRNS-Gene	4 Operonen mit 16S-23S-5S rRNS-Genen ^(a)	1 Operon mit 16S-23S-5S rRNS-Genen	1 Operon mit 16S-23S rRNS-Genen ^(c)
5S rRNS-Gene	ein zusätzliches Operon aus 1 5S rRNS- u. 7 tRNS-Genen ^(b)	ein zusätzliches Operon aus 2 5S rRNS- u. 7 tRNS-Genen	ein 5S rRNS-Gen, das einzeln im Genom liegt ^(c)
tRNS-Gene	15 der 19 analysierten tRNS- Gene ^(a,b) liegen in Operonen	7 der 7 analysierten tRNS- Gene liegen in Operonen	alle 5 analysierten tRNS- Gene liegen einzeln im Genom
<u>Struktur der tRNS-Gene</u>			
3' OCA-Ende	3 der 19 ^(a,b) analysierten tRNS-Gene kodieren das 3' OCA-Ende	1 der 7 analysierten tRNS- Gene kodiert das 3'OCA-Ende	keines der 5 analysierten tRNS-Gene kodiert das 3'OCA-Ende
Introns	keines der 19 tRNS-Gene enthält ein Intron	keines der 7 tRNS-Gene enthält ein Intron	4 der 5 tRNS-Gene enthalten ein Intron

(a) Jarsch et al., 1983; (b) Wich et al., 1984; (c) Kjems et al., 1987

Transkriptionseinheiten zusammengefaßt. Eine ähnliche Struktur wurde vor kurzem für das Archaeobakterium *Thermococcus* (Tc.) *celer* beschrieben (Culham und Nazar, im Druck). Hier liegt das 5S rRNS-Gen nur mit einem tRNS-Gen zusammen in einer Transkriptionseinheit, die jedoch, wie in *M. voltae* und *M. vannielli*, für eine tRNS^{Asp} kodiert.

Die Organisation der Gene stabiler RNS in dem thermophilen, schwefelabhängigem Archaeobakterium *T. tenax* weicht in einer Reihe von Merkmalen von der in *Methanococcus* ab (Tab. 3). Ähnlich wie in Eukaryonten sind nur die Gene für 16S und 23S rRNS zu einem Operon zusammengefaßt. Das 5S rRNS-Gen bildet eine eigenständige Transkriptionseinheit. Gleiches konnte für die schwefelabhängigen Archaeobakterien, *Sulfolobus acidocaldarius* (Reiter et al., 1987) und *Desulfurococcus mobilis* (Larsen et al., 1987), gezeigt werden. Das 5S rRNS-Gen von *Desulfurococcus mucosus* liegt dagegen eng benachbart zu den 16S und 23S rRNS-Genen dieses Organismus; ob es mit diesen eine transkriptionelle Einheit bildet, ist nicht bekannt (Neumann et al., 1983).

Die tRNS-Gene aus *T. tenax* sind im Gegensatz zu denen von *Methanococcus* nicht in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert. Dies gilt nicht nur für die fünf analysierten tRNS-Gene dieses Organismus, auch für sieben tRNS-Gene aus dem schwefelabhängigen Archaeobakterium *Sulfolobus* konnte kein Hinweis auf Operonstrukturen gefunden werden (Kaine et al., 1983; Kaine, 1987).

Es wurde wiederholt als "eukaryontische Eigenschaft" der Archaeobakterien diskutiert, daß ihre tRNS-Gene das 3' CCA-Ende nicht in der DNS kodieren (Kaine et al., 1983; Daniels et al., 1986; Kaine, 1987). Diese Vorstellung scheint sich für die hier analysierten methanogenen Archaeobakterien nicht voll zu bestätigen.

Drei der 19 tRNS-Gene aus *M. vannielli* und eines der sieben tRNS-Gene aus *M. voltae* beinhalten das 3' CCA-Ende (Tab. 3).

Ebenso besitzt *Thermococcus celer*, der phylogenetisch in die Nähe von *Methanococcus* gestellt wird (Woese und Olson, 1986), ein tRNA^{Asp}-Gen mit kodiertem 3' CCA-Ende (Culham und Nazar, im Druck). Bis jetzt wurde jedoch noch kein tRNA-Gen eines schwefelabhängigen Archaeobakteriums gefunden, das das 3' CCA-Ende kodiert (Kaine et al., 1983; Kaine, 1987; Wich, diese Arbeit).

Eine häufige Eigenschaft der tRNA-Gene von thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterien ist es, daß die kodierenden Bereiche durch Intronsequenzen unterbrochen sind. Dies trifft für vier der fünf untersuchten *Thermoproteus* tRNA-Gene (Tab. 3) und für sechs der sieben analysierten tRNA-Gene aus *Sulfolobus* zu (Kaine et al., 1983; Kaine, 1987). Diese Eigenschaft ist nicht auf die schwefelabhängigen Archaeobakterien beschränkt. Inzwischen wurde nämlich ein tRNA-Gen eines halophilen Archaeobakteriums, *Halobacterium volcanii*, beschrieben, das ein Intron besitzt (Daniels et al., 1986). In einem anderen stabilen rRNA-Genotyp, einem 23S rRNA-Gen aus dem thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterium *Desulfurococcus mobilis*, wurde ebenfalls ein Intron nachgewiesen (Kjems und Garrett, 1985). Introns in stabilen rRNA-Genen wurden häufig für eukaryontische, kernkodierte tRNA-Gene, für mitochondriale und für plastidäre tRNA-Gene beschrieben (siehe Sprinzl et al., 1985b), aber bis jetzt noch nicht in Eubakterien gefunden. Keines der 26 untersuchten tRNA-Gene aus *Methanococcus* besitzt ein Intron.

Es gibt Hinweise, daß Archaeobakterien, und unter ihnen vor allem die Gruppe der schwefelabhängigen Organismen, langsame Evolutionsraten besitzen und damit einen "primitiven" ursprünglichen Phänotyp darstellen (siehe Woese, 1987). In ihren Genen werden, wie in eukaryontischen Genen, häufig Introns gefunden. Dies weist darauf hin, daß es sich bei der Organisation von Genen in kodierende Exonbereiche und nichtkodierende Intronbereiche nicht um eine spät in der Evolution erworbene Eigenschaft handelt, sondern daß dies eine Eigenschaft früher, ursprünglicher Genstrukturen war. Dafür spricht auch, daß auch

einige "eubakterielle" Systeme, wie Chloroplasten, Mitochondrien oder der Bakteriophage T4, Introns besitzen (Chu et al., 1984). Eine ausführliche Diskussion dieser Idee wurde vor kurzem von Doolittle und Darnell (1986) sowie von Clarke (1987) veröffentlicht.

Will man der gleichen Argumentation folgen, so weist das Fehlen des 3'CCA-Endes in archaeobakteriellen, eukaryontischen und einigen eubakteriellen tRNS-Genen darauf hin, daß posttranskriptionale Modifikation eine frühe Eigenschaft der tRNS-Synthese sein mußte (siehe auch Kaine, 1987).

Auf dem Niveau der Genorganisation würden dann einzelliegende, monocistronisch transkribierte tRNS- und rRNS-Gene den ursprünglichen Typ verkörpern. Dies würde bedeuten, daß das eukaryontische Genom, trotz oder eben gerade wegen der komplizierten Mechanismen der Regulation und Differenzierung noch eine Reihe sehr ursprünglicher Merkmale bewahrt hat. In Eubakterien und in einem Teil der Archaeobakterien hat eine Evolution in Richtung auf eine Optimierung der Effizienz zu einem "Stream-lining"-Prozeß geführt.

M. voltae und *M. vannielii* besitzen 5S rRNS-Gene, die nicht mit anderen rRNS-Genen in Transkriptionseinheiten zusammengefaßt sind (Tab. 3). Diese "extra" 5S rRNS-Gene weichen in ihrer Sequenz von den 5S rRNS-Genen der ribosomalen Operonen erheblich ab (Tab. 3). Für das "extra" 5S rRNS-Gen und die 5S rRNS-Gene der rRNS-Operonen in *M. vannielii* weisen rRNS-Sequenzanalysen darauf hin, daß tatsächlich beide Gentypen exprimiert werden, und daß die Genprodukte auch in die Ribosomen eingebaut werden (siehe Jarsch und Böck, 1985).

Daraus können eine Reihe von Schlüssen gezogen werden:

- Die verschiedenen Zahlen von 5S rRNS-Genkopien in rRNS-Operonen und von "extra" 5S rRNS-Genkopien in *M. voltae* und *M. vannielii* (Tab. 4) zeigen, daß ihre Produkte trotz erheblicher Unterschiede in der Primärstruktur funktionell äquivalent sind.

- Alle 5S rRNS-Gene der rRNS-Operonen in *M. vannielii* besitzen identische Sequenz (Jarsch und Böck, 1985). Da die Produkte beider 5S rRNS-Gentypen funktionell äquivalent sind, kann die völlige Konservierung dieser 5S rRNS-Gene nicht die Folge eines biologischen Druckes auf die Primärstruktur sein, sondern muß einen rRNS-Operon spezifischen Mechanismus darstellen, zum Beispiel eine "Gleichrichtung" von Mutationen durch Rekombination.
- Der Vergleich der Sequenzen des einzelliegenden und der Operon-kodierten 5S rRNS-Gene deutet darauf hin, daß sie sich in einem ursprünglichen methanogenen Archaeobakterium, vor Aufspaltung in die beiden Spezies *M. voltae* und *M. vannielii*, entwickelt haben.

Tabelle 4: Sequenzhomologien der "extra" 5S rRNS-Gene (1) und der Gene der rRNS-Operonen (2) aus *M. voltae*, *M. vannielii* und *Tc. celer*

	a)	b)	c)	d)	e)
a) <i>M. voltae</i> (1)	-	9	11	20	33
b) <i>M. vannielii</i> (1)	93	-	16	13	33
c) <i>M. voltae</i> (2)	91	86,5	-	11	40
d) <i>M. vannielii</i> (2)	83	89	91	-	43
e) <i>Tc. celer</i> (1)	72,5	72,5	66	64	-

Der rechte obere Teil gibt die Anzahl der Unterschiede in der Primärstruktur wieder, der linke untere zeigt die Sequenzhomologie in Prozenten.

Vor kurzem wurde eine 5S rRNS/tRNS-Transkriptionseinheit auch für das mit *Methanococcus* verwandte thermophile Archaeobakterium, *Tc. celer*, beschrieben (Culham und Nazar, im Druck). Zwei Merkmale der Primärstruktur dieses *Thermococcus* "extra" 5S

rRNS-Gens erscheinen in diesem Zusammenhang interessant: Zum einen steht seine Sequenz derjenigen des "extra" 5S rRNS-Gens von *M. voltae* und *M. vannielii* näher als der der betreffenden rRNS-Operon-Gene (Tab. 4); zum anderen weisen die 5S rRNS-Sequenzen darauf hin, daß das "extra" 5S rRNS-Gen und das 5S rRNS-Gen des rRNS-Operons dieses Organismus identische Sequenzen besitzen müssen.

Aus den in Tabelle 4 gezeigten Beziehungen der verschiedenen 5S rRNS-Gentypen kann der in Abbildung 35 gezeigte, spekulative Weg ihrer Evolution abgeleitet werden.

II. Signale der Transkription

1. Promotorstrukturen der Gene stabiler RNS aus *Methanococcus* und *Thermoproteus*

Der Promotorbereich der Gene stabiler RNS in *Methanococcus* enthält zwei konservierte Primärstrukturelemente (Abb. 17), einen 16 Basenpaar umfassenden Homologiebereich A (Box A) und 23 bis 24 Basenpaare "stromabwärts", einen kürzeren Homologiebereich B (Box B). Für "Box" B wurde gezeigt, daß sie den sequenzkonservierten Startpunkt der Transkription darstellt (Abb. 17). Dagegen ist es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich, "Box" A eine Funktion zuzuweisen. Eine Reihe von Argumenten unterstreicht jedoch, daß ihr eine essentielle Rolle im Prozeß der Transkriptionsinitiation zukommt.

- Die Sequenz der "Box" A von neun untersuchten Transkriptionseinheiten für Gene stabiler RNS in *M. vannielii* ist in mindestens 12 von 16 Basenpaaren konserviert.
- Zwischen dem Initiationspunkt der Transkription ("Box" B) und dem "Box" A-Motiv besteht ein konstanter Abstand von 23 bis 24 Basenpaaren, während der Abstand zum ersten kodierenden

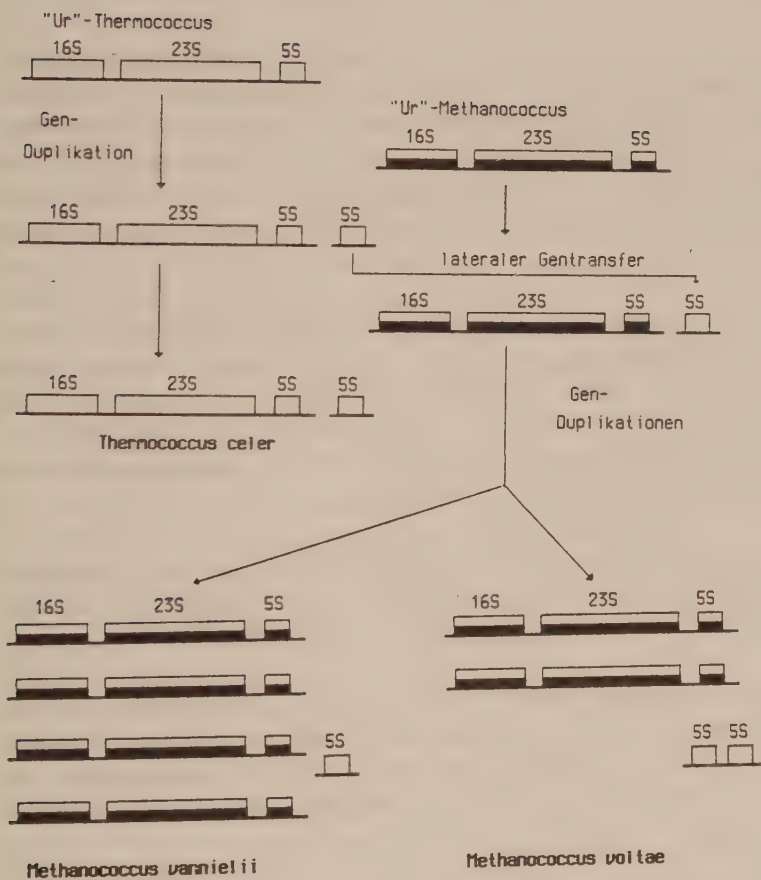


Abb. 35: Hypothetischer Verlauf der Evolution von "extra" 5S rRNS-Genen in *Thermococcus* und *Methanococcus*

Sequenzbereich sehr unterschiedlich sein kann (von 159 Basenpaaren im rRNS-Operon bis zu 11 Basenpaaren in dem tRNS/5S rRNS Operon).

- Ein Vergleich der 5' flankierenden Bereiche zweier ribosomaler RNS-Operonen von *M. vannielii* (siehe Abb. 14) zeigt, daß die Sequenz bis zur Position -213 relativ zum 16S rRNS-Gen, völlig konserviert ist, während "stromaufwärts" dieser Position keine weitere Sequenzähnlichkeit zu finden ist. Der "Box" A- und "Box" B-Bereich ist im 5'-proximalen Teil dieser Region gelegen.
- Beide Homologiebereiche sind in dem tRNS/5SrRNS-Operon aus *M. voltae* konserviert (Abb. 17). Selbst in dem nur entfernt verwandten Archaeobakterium *Thermococcus celer* findet man, daß der "Box" A-Homologiebereich des tRNS/5S rRNS-Genclusters in 13 von 16 Positionen mit der *Methanococcus*-Sequenz übereinstimmt (Culham und Nazar, im Druck).
- In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine RNS-Polymerase aus *M. vannielii* an einem rRNS-Operon und an einem tRNS-Operon spezifisch in diesem Bereich bindet.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der Box A eine Rolle in der Erkennung und Bindung der RNS-Polymerase zukommt. Ein Beweis dieser Annahme kann nun durch Bindungsanalysen mit spezifisch in diesem Bereich mutierten Gensequenzen erbracht werden.

Die Tatsache, daß der "Box" A- und der "Box" B-Bereich in den intercistronischen Regionen der divergent orientierten tRNS-Transkriptionseinheiten von pMT11 und pMT22 nicht nur zweifach vorliegen, sondern ebenfalls divergent orientiert und damit auf unterschiedlichen DNS-Strängen kodiert sind (siehe Abb. 3a,b), läßt den Schluß zu, daß die Sequenzelemente eine festgelegte Richtung benötigen. Es handelt sich bei ihnen also keinesfalls

um unspezifische AT-reiche Regionen, wie sie als DNS-Elemente für die Initiation an Genen methanogener Archaeobakterien vermutet wurden (Bollschweiler et al., 1985).

Die Promotorbereiche der Gene stabiler RNS des schwefel-abhängigen Archaeobakteriums *T. tenax* zeichnen sich durch eine extrem AT-reiche Region von 13 bis 16 Basenpaaren aus, die in einem Abstand von 18 bis 20 Basenpaaren zum Transkriptionsstart liegt (Abb. 29). Eine solche Struktur muß bei den extremen Wachstumstemperaturen dieses Organismus (Wachstum bis 98°C) als sehr instabil angesehen werden und bietet sich deshalb als Eintrittsstelle für eine RNS-Polymerase an.

Wie die beiden divergent transkribierten tRNS-Gene des rekombinanten Plasmids pTT2/5 zeigen, scheinen auch diese AT-Regionen eine festgelegte Orientierung zu benötigen (Abb. 23).

Es ist ungewöhnlich, daß die Transkription des tRNS^{Met}-Gens aus *T. tenax* direkt am 5' Ende des Strukturgens erfolgt (Abb. 29). Alle bis jetzt analysierten tRNS-Primärtranskripte aus Eukaryonten und aus Eubakterien besitzen zusätzliche Nukleotide an ihrem 5' und auch 3' Ende (siehe Deutscher, 1984). Bemerkenswerterweise zeigten RNS-Sequenzierungen, daß die Initiator-tRNS^{Met} aus dem halophilen Archaeobakterium *Halobacterium volcanii* ein Triphosphat an ihrem 5' Ende besitzt (Gupta, 1984). Dies weist darauf hin, daß die erste Base dieser tRNS gleichfalls die erste Base des Transkriptes ist. Für ein 5S rRNS-Gen aus *Sulfolobus* wurde kürzlich durch S1-Kartierung und "Capping"-Experimente ebenfalls gezeigt, daß die Transkription mit dem ersten Nukleotid des reifen Gens startet (Reiter et al., 1987).

Polymerasebindungsanalysen an Promotoren aus *T. tenax* stehen bis jetzt noch aus; es ist deswegen noch nicht bekannt, ob die RNS-Polymerase im Bereich der oben erwähnten AT-reichen Region bindet. In vitro Transkriptionsanalysen zeigten jedoch, daß die RNS-Polymerasen aus *Thermoproteus* und aus dem verwandten Archaeobakterium *Desulfurococcus* ihre höchste Aktivität mit Poly

d (AT) als Matrize erreichen und daß sie im Bereich bestimmter AT-Sequenzen in T7-DNS initiieren (Prangishvilli et al., 1982), ein Indiz, daß AT-reiche Regionen tatsächlich als Startregion dieser Polymerasen dienen können.

2. Konsensuselemente archaebakterieller Promotoren

Die beschriebenen Analysen der Promotorsequenzen von Genen stabiler RNS führen zwangsläufig zu zwei Fragen:

- Spielen die hier identifizierten Sequenzelemente auch eine Rolle in der Transkriptionsinitiation an Genen, die für Proteine kodieren?
- Gibt es einen "generellen" archaebakteriellen Promotor?

Abbildung 36 zeigt die 5' flankierenden Bereiche derjenigen archaebakteriellen Gene, für die der Startpunkt der Transkription bekannt ist. Der Vergleich umfaßt Gene stabiler RNS aus den methanogenen Archaebakterien *M. vanniellii* und *M. voltae* (diese Arbeit), aus den halophilen Archaebakterien *Halobacterium (H.) cutirubrum*, *H. volcanii* und *H. halobium* (Chant und Dennis, 1986; Daniels et al., 1986; Moritz et al., 1985) und den thermophilen, schwefelabhängigen Archaebakterien *Thermoproteus tenax* (diese Arbeit) und *Sulfolobus acidocaldarius* (Reiter et al., 1987). Zu Genen, die für Proteine kodieren, sind Daten aus *M. vanniellii* (Brown et al., zur Veröffentlichung eingereicht), *H. halobium* (DasSarma et al., 1984; Betlach et al., 1984) und dem virusähnlichen Partikel SSV1 aus *Sulfolobus* (Reiter et al., zur Veröffentlichung eingereicht) verfügbar. Damit sind Gene aus jeder der drei phylogenetischen Verwandtschaftsgruppen der Archaebakterien vertreten.

Ihr Vergleich (Abb. 36) zeigt, daß nicht der gesamte "Box" A-Homologiebereich der Promotoren aus *Methanococcus* konserviert ist. Zu dem AT-reichen Bereich dieser "Box" A mit der Sequenz 5' TTTATATA³, also gerade zu den acht Basen, die im

STABILE RNS KODIERENDE GENE

ATACCTAAACCAATACATATTACAACACGTTTTTCATATTATGCAAAAT	M.vannielii rRNS
TAACCGAAATATTTATATACATAGAATACCCTTCCTATACTATGCTCT	M.vannielii tRNS
CTACCGAAACCTTTATATATTATAACACTAGTATTCAGTATGCGAAC	M.vannielii 5S/tRNS
TTGACGGTGTTTTATGTACCCACCACCTCGGATGAGATGCGAACGA	H.cutirubrum rRNS P1
AGTCCGATGCCCTTAAGTACAACAGGTACTTCGGTGGAAATGCGAAC	H.cutirubrum rRNS P2
GATTCGATGCCCTTAAGTAAATAACGGGTGTTCCGATGAGATGCGAAC	H.cutirubrum rRNS P3
GATTCGATGCCCTTAAGTAAATAACGGGGCGTTACGAGGAATGCGAAC	H.cutirubrum rRNS P4
GATTCGATGCCCTTAAGTAAATAACGGGGCGTTCCGGGAAATGCGAAC	H.cutirubrum rRNS P5
AAACAGAAGTCCTTAACATAGCCAGACTCGTTTGTGTATCATGCGCCC	H.volcanii tRNS
AGCGAAAAATTTTAAATTTAGGGTGTTTAGGATGGTCGCGCCTTAA	T.tenax rRNS
TAGCGAAAAATTTTAAATCGGTGAGTAAGTACGCTCGGGCCGGTAG	T.tenax tRNS
GACAAAAGCTTTTAAATTCGCGAAAGCTTAGACCTAGCGGGGTAG	T.tenax tRNS
TAGAAGTTAGATTTATATGCGATTTCAGAACATATGTATAATGCGG	S.sulfataricus rRNS
GTAGTTAATTTTATATGTGTTATGAGTACTTAATTTTGCACCCC	S.sulfataricus 5SrRNS

PROTEIN KODIERENDE GENE

TCTTAGGTACCAATATATATGTTAAACCTAATTTAACATAGTTTTA	M.vannielii hisA
TGGGTCGTAGAGTTACACACATATCCTCGTTAGGTACTGTTGCATGT	H.halobium bop
CCTTGGGTCTTTTTTGTAGTCTCGGTAGTGACGTGTGTATTCATATGA	H.halobium brp
AACTGGAGGGGTTTAAAAACGTAAGCGGGAAGCCGATATTGACCAAG	SSV1 T1+T2
GTTAGGCTCTTTTAAAGTCTACCTTCTTTTTCGCTTACAATGAGGA	SSV1 T3
AGATAGCCCTTTTAAAGCCATAAAATTTTTTATCGCTTAATGAAGTG	SSV1 T4
ATAGAGTAAGACTTAAATACTAATTTTATACATAGAGTATAGATAGAG	SSV1 T5
ATAGAGTAAAGTTAAATACTTATATAGATAGAGTATAGATAGAGG	SSV1 T6

KONSENSUS:

ARCHAEBAKTERIEN:	T T T A T A T A ----18-26----	A T G C T A
EUKARYONTEN:	T A T A T A T A ----20-26----	py C A py

Abb. 36: Vergleich der 5' flankierenden Sequenz verschiedener archaebakterieller Gene:

Der Startpunkt der Transkription ist jeweils durch einen kleinen Buchstaben gekennzeichnet. Konservierte Basen um den Transkriptionsstart sind unterstrichen. Ein Oktanukleotid, das in allen Promotorregionen konserviert ist, ist umrandet. Die abgeleitete Konsensussequenz des archaebakteriellen Promotors ist mit der Konsensussequenz eukaryontischer Promotoren der RNS-Polymerase II verglichen.

Bindungsbereich der RNS-Polymerase liegen, findet sich jedoch in jeder der 22 aufgeführten Promotorsequenzen ein entsprechendes Sequenzäquivalent.

Der "Box" B-Homologiebereich ist in den untersuchten methanogenen/halophilen Archaeobakterien und in der Gruppe der schwefelabhängigen Archaeobakterien bei *Sulfolobus* konserviert. Die Distanz zwischen "Box" A und "Box" B, beziehungsweise der Abstand zwischen "Box" A und dem Transkriptionsstart variiert nur um wenige Basen.

Es fällt auf, daß die "Box" A und B Motive in *Methanococcus* und in *Sulfolobus* eine sehr hohe Ähnlichkeit besitzen: Sie sind bis auf eine Base identisch (Abb. 36). Dies zeigt, daß diese Sequenzelemente in *Methanococcus* und *Sulfolobus* seit der Trennung der beiden großen phylogenetischen Gruppen der Archaeobakterien weitgehend konserviert wurden und beweist damit den hohen Grad ihrer biologischen Bedeutung.

Der Bindungsbereich der RNS-Polymerase wurde vor kurzem auch an einem Gen aus *M. vannielii*, das für ein Protein kodiert, durch DNase I und Exonuklease III-"Footprinting"-Analysen bestimmt (Brown et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Wie Abbildung 35 zeigt, stimmt der Bindungsbereich der Polymerase an diesem Promotor mit dem von Promotoren für rRNS- und tRNS-Gene sehr gut überein.

Auf der Basis dieser Ergebnisse erscheint es gerechtfertigt, eine -25 Region mit der Sequenz $5' \text{TTTA}^{\text{T}}\text{ATA}^{\text{T}} 3'$ (Abb. 35) als ein Element des archaeobakteriellen Promotors zu fordern. Auch der Transkriptionsstart ist in methanogenen, halophilen und in einer Reihe von schwefelabhängigen Archaeobakterien in den Nukleotiden $5' \text{A}^{\text{T}}\text{TG}^{\text{C}}\text{A}^{\text{T}} 3'$ konserviert.

Archaeobakterielle Promotoren unterscheiden sich damit durch das Fehlen eines Sequenzelementes, das homolog der eubakteriellen -35 Region ist, und durch den unterschiedlichen Abstand der AT-reichen Regionen zum Transkriptionsstart deutlich von

eubakteriellen Promotoren. In Einklang damit steht, daß die RNS-Polymerase aus *Methanococcus* nicht an einen starken eubakteriellen Promotor bindet (Abb. 20).

Beides, die Sequenz des archaeobakteriellen Konsensus-Okta-nukleotids und die Lokalisation an der Nukleotidposition -25, erinnert an eukaryontische Promotoren, die von RNS-Polymerase II erkannt werden (Abb. 36). Die schon früher beschriebene und inzwischen durch Protein- und DNS-Sequenzen bestätigte hohe Homologie zwischen archaeobakteriellen RNS-Polymerasen und eukaryontischen RNS-Polymerasen des Types II (Huet et al., 1983; Zillig, persönliche Mitteilung) scheint sich also auch in den entsprechenden Promotorsequenzen widerzuspiegeln.

3. Prozessierungssignale stabiler RNS in *Methanococcus* und *Thermoproteus*

rRNS-Vorläufermoleküle von *M. vannielii* werden über endonukleolytische Schnitte an kurzen Unterbrechungen der basengepaarten Regionen, die die Sequenzbereiche der 16S rRNS und der 23 rRNS flankieren, prozessiert (Abb. 14b). Analoge Prozessierungsstellen sind inzwischen für das halophile Archaeobakterium *Halobacterium cutirubrum* (Chant et al., 1986) und für die thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterien *Desulfurococcus mobilis* und *Thermoproteus tenax* (Kjems und Garrett, 1987; Kjems et al., 1987) beschrieben worden.

Wie Abbildung 37 zeigt, ist an diesen Prozessierungsstellen vor allem die Sekundärstruktur, in geringem Maße aber auch die Primärstruktur konserviert. Diese Prozessierungssignale, die ein universelles Prinzip archaeobakterieller prä-ribosomaler RNA-Prozessierung darzustellen scheinen, besitzen Ähnlichkeit mit den äquivalenten RNase III-Schnittstellen eubakterieller rRNS-Vorläufermoleküle (Abelson, 1979).

Primäre Transkripte und Prozessierungsintermediate des rRNS-Operons werden in *M. vannielii* unter Bedingungen, unter denen die Proteinsynthese zu erliegen kommt, akkumuliert (Abb. 12b).

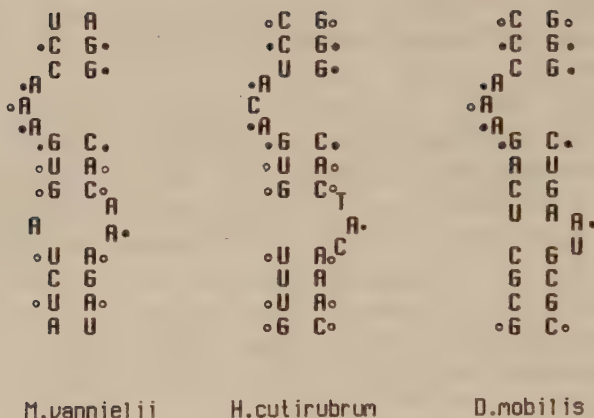


Abb. 37: Prozessierungssignale der 16S rRNS-Vorläufermoleküle in verschiedenen Archaeobakterien: Nukleotide, die in zwei der drei Signalstrukturen konserviert sind, sind durch Kreise gekennzeichnet; Nukleotide, die in allen dreien an identischer Stelle vorkommen, sind durch Punkte markiert.

Dies bestätigt den Schluß, daß die Synthese der stabilen RNS in diesem Archaeobakterium regulatorisch nicht so eng mit der Proteinsynthese gekoppelt ist wie in Eubakterien (Maaloe und Kjeldgaard, 1966; Beauclerk et al., 1985).

Wie bereits erwähnt, werden eine Anzahl von tRNS-Genen in *Methanococcus* cotranskribiert. Damit ergibt sich die Notwendigkeit, die reifen tRNS-Moleküle aus einem Vorläufertranskript zu prozessieren. Prozessierende Enzyme können entweder die reife tRNS-Struktur oder spezifische Signale der tRNS-flankierenden RNS-Region erkennen. Diese intercistronischen Bereiche der tRNS-Gene in *Methanococcus* haben folgende Merkmale gemeinsam (Abb. 38):

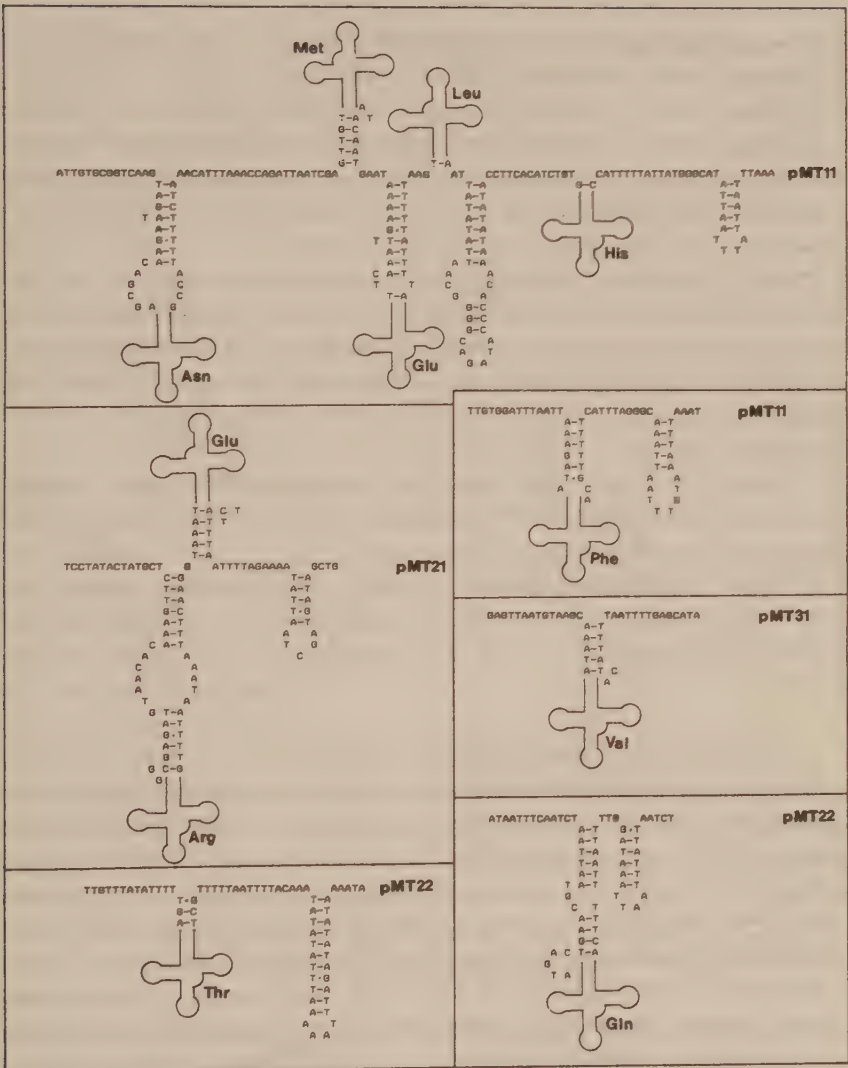


Abb. 38: Mögliche Sekundärstrukturen der tRNS-Vorläufermoleküle aus *M. vanniellii*

- Sie besitzen keine konservierten Primärstrukturelemente;
- sie sind sehr AT-reich;
- es gibt einen Konsensus in den möglichen Sekundärstrukturen der Sequenzen, die die kodierenden Bereiche umgeben. In den meisten Fällen kann der Aminoacylarm der reifen tRNS durch Basenpaarung verlängert werden, wobei einige Basen direkt neben der kodierenden Region nicht paaren.

Ähnliche Strukturen werden als Prozessierungssignale in Eubakterien angesehen (Nakaijama et al., 1980; Rossi und Landy, 1979; Deno und Sugiura, 1989; Ohme et al., 1985). Einen biologischen Beweis für diese Annahme gibt es bis jetzt jedoch in keinem System.

Der größte Teil der tRNS-Gene des schwefelabhängigen Archaeobakteriums *T. tenax* enthält Intronsequenzen, die in der reifen tRNS exakt herausgespleißt sind.

Eine Reihe von Charakteristika dieser tRNS-Introns lassen vermuten, daß zwischen den Spleißmechanismen in diesen thermophilen Archaeobakterien und in Eukaryonten Unterschiede bestehen:

- Im Gegensatz zu eukaryontischen, kernkodierten tRNS-Molekülen (Sharp et al., 1985) ist die Lage der Intronsequenz in den tRNS-Vorläufermolekülen nicht konserviert. Die Lokalisation eines Introns innerhalb der Anticodonsequenz (wie im Falle des tRNS^{Leu}-Gens; Abb. 24) wurde bis jetzt nur für zwei weitere tRNS-Gene, einem plastidären tRNS^{Leu}-Gen aus *Vicia faba* und einem plastidären tRNS^{Leu}-Gen aus *Sorghum bicolor* gefunden (Bonnard et al., 1984; Ma und Doebley, 1986). Die Lage eines Introns 5' zum Anticodon innerhalb des Anticodonarms ist bisher nur für zwei tRNS^{Ala}-Gene (Abb. 24) aus *T. tenax* nachgewiesen.
- Die Sekundärstruktur der Introns weicht von der für eukaryontische tRNS-Gen-Introns beschriebenen Konsensusstruktur (Sharp et al., 1985) ab.

- Die Eigenschaft, eine tRNS-ähnliche Sekundärstruktur zu bilden, ist wichtig für die Substraterkennung und spezifische Spaltung eukaryontischer tRNS-Vorläufermoleküle durch die spleißenden Enzyme (Sharp et al., 1985). Es ist ungeklärt, wie solche Strukturen in hochthermophilen Organismen, wie *Thermoproteus* (Wachstum bis 98°C), stabilisiert werden.

Weitere Hinweise, daß sich die Spleißmechanismen in Archaeobakterien und Eukaryonten unterscheiden, ergeben sich aus ersten Analysen der Reaktion in *H. cutirubrum* (Daniels et al., 1986). Im Gegensatz zu Eukaryonten benötigen die spleißenden Enzyme kein ATP für ihre Reaktion. Auch konnte eine angereicherte Enzymfraktion aus *Halobacterium* ein tRNS-Vorläufermolekül aus Hefe nicht prozessieren.

Das vorgestellte in vitro Transkriptionssystem für *T. tenax* kann dazu dienen, die Intron-Prozessierung auch in diesem thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterium aufzuklären.

4. Terminationssignale

Es wurde gefunden, daß die Termination der Transkription in einem rRNS-Operon aus *M. vannielii* an einem Oligo-dT-Bereich unmittelbar 3' des 5S rRNS-Gens stattfindet. Eine vergleichbare Sequenz ist nach dem distalen Gen in jeder der untersuchten Transkriptionseinheiten stabiler RNS aus *M. vannielii* konserviert (Abb. 18). Diese Signale besitzen Ähnlichkeit mit Terminationssignalen der Transkription von tRNS-Genen in Eukaryonten.

In *H. cutirubrum* konnte für ein rRNS-Operon gezeigt werden, daß die Transkription nicht etwa an einer umgekehrt repetitiven und von vier T-Resten gefolgten Sequenz terminiert, also nicht an einer Struktur, die einem eubakteriellen Terminator ähnelt. Statt dessen liegt die Terminationsstelle nach einem distalen tRNS^{Cys}-Gen innerhalb eines Oligo-dT-Bereiches (Chant et al., 1984). Die Transkripte der rRNS-Operonen der schwefelabhängigen

Archaeobakterien *T. tenax* und *D. mobilis* terminieren ebenfalls innerhalb einer Pyrimidin-reichen Sequenz (Kjems und Garrett, 1987; Kjems et al., 1987).

S1-Kartierungsanalysen an einem archaeobakteriellen Proteingen, namentlich dem Methyl-CoM-Reduktase-Gen von *M. voltae*, zeigten überraschenderweise, daß hier die Terminationsregion ein kurzer Oligo- dT-Bereich nach einer umgekehrt repetitiven Sequenz darstellt (Müller et al., 1984). Sollte es sich erweisen, daß diese "stem/loop"-Struktur für die Termination an diesem Gen notwendig ist, so besteht die Möglichkeit, daß die RNS-Polymerase unterschiedliche Terminationssignale nach Genen stabiler RNS und Protein-kodierenden Genen erkennt.

III. Eine Restriktionsendonuklease aus *T. tenax*

Eine Restriktionsendonuklease mit der Erkennungssequenz $5' \text{GC} \overset{\text{A}}{\underset{\text{T}}{\text{C}}} \text{GC} 3'$ wurde im S100-Extrakt aus *T. tenax* charakterisiert. Das Enzym erzeugt DNS-Enden, die 5' um drei Basen überhängen.

Von einem Restriktionsenzym aus *Bacillus brevis* wird die gleiche Sequenz in der DNS erkannt. Bis jetzt wurde jedoch noch nicht bestimmt, wie dieses Enzym innerhalb der Sequenz schneidet (Kessler und Hölte, 1987).

Restriktionsendonukleasen bei Archaeobakterien sind bisher für *Methanococcus* (*M.*) *aeolicus*, *Thermococcus* (*Tc.*) *celer*, *Thermoplasma acidophilum* und für die schwefelabhängigen Archaeobakterien *Sulfolobus* und *Desulfurococcus* gefunden worden (McConnel et al., 1978; Schmidt et al., 1985). Mit der Ausnahme der Enzyme aus *M. aeolicus*, sind es jedoch alles Isoschizomere zu bereits beschriebenen eubakteriellen Enzymen.

Restriktionsenzyme sind wertvoll bei der Analyse der Struktur und Funktion von Nukleinsäuresequenzen. Es besteht deshalb großes Interesse, Enzyme mit neuen Sequenzspezifitäten zu finden. Einer kommerziellen Ausnützung des Enzyms aus *T. tenax*

stehen jedoch zwei Schwierigkeiten im Weg: Zum einen ist die Ausbeute an Zellmasse bei relativ aufwendigen Kultivierungsbedingungen (strikt anaerob, Temperatur 90°C) sehr gering, und zum anderen ist das ungewöhnliche Reaktionsoptimum mit einer Temperatur um 90°C nahe der Denaturierungstemperatur von DNS-Fragmenten ungünstig. Es ist denkbar, dieses Problem durch Klonierung und Expression des betreffenden Genes in einem mesophilen, leicht kultivierbaren Wirt wie *E. coli* zu umgehen. Wenn ausreichende Mengen der Restriktionsendonuklease mit vertretbarem technischem Aufwand verfügbar sind, so kann das Enzym auch bei Temperaturen unter seinem Reaktionsoptimum eingesetzt werden.

Das Enzym kann auch als Modell zur Untersuchung der interessanten Frage herangezogen werden, wie Nukleinsäure-Proteininteraktionen bei Temperaturen nahe 100°C erfolgen können.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese der stabilen RNS-Spezies, ebenso wie die Synthese der mRNA, wird durch spezifische, in der DNS kodierte Signale kontrolliert. Die Konsensussequenzen eubakterieller und eukaryontischer Promotor- und Terminatorregionen sind inzwischen gut charakterisiert. Durch die Analyse einer Reihe von Transkriptionseinheiten für rRNS- und tRNS-Gene der methanogenen Archaeobakterien *Methanococcus* (M.) *vannielii* und *Methanococcus* (M.) *voltae* und des thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakteriums *Thermoproteus* (T.) *tenax* sollte geklärt werden, wie Transkriptionssignale in dieser dritten großen phylogenetischen Gruppe der Organismen aufgebaut sind. Zusätzlich wurden durch diese Untersuchungen neue Informationen zum Aufbau und zur Organisation archaeobakterieller Gene gewonnen:

1. Aus *M. vannielii* wurden 11 tRNS-Gene kloniert und sequenziert. Sieben der 11 Gene sind in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert; ein tRNS-Operon enthält fünf tRNS-Gene, das andere zwei tRNS-Gene.
2. Wie bei anderen methanogenen und halophilen Archaeobakterien sind in *M. voltae* 16S rRNS, 23S rRNS und 5S rRNS zu rRNS-Operonen "eubakteriellen" Typs zusammengefaßt. *M. voltae* hat nur ein rRNS-Operon. Zusätzlich besitzt *M. voltae* zwei "extra" 5S rRNS-Gene, die mit sieben tRNS-Genen eine Transkriptionseinheit bilden. Der Vergleich der Sequenzen des 5S rRNS-Gens des rRNS-Operons und der "extra" 5S rRNS-Gene aus *M. voltae* mit den homologen Genen aus *M. vannielii* (Wich et al., 1984) und aus *Tc. celer* (Culham und Nazar, im Druck) lieferte Hinweise, daß *M. voltae* und *M. vannielii* ihre "extra" 5S rRNS-Gene durch horizontalen Gentransfer aus *Thermococcus* übernommen haben.

3. Keines der tRNS-Gene aus *M. vannielii* und *M. voltae* enthält Introns. Im Gegensatz zu allen anderen bisher analysierten tRNS-Genen aus Archaeobakterien scheinen sie in einigen Fällen das 3' CCA-Ende der reifen tRNS zu kodieren.
4. Der Startpunkt der Transkription wurde an einer der tRNS-Transkriptionseinheiten, an einem rRNS-Operon (Jarsch und Böck, 1985) und an der 5S rRNS/tRNS-Transkriptionseinheit (Wich et al., 1984) von *M. vannielii* durch S1-Kartierung bestimmt. Im Falle des rRNS-Operons wurde das primäre Transkript durch "Capping"-Experimente nachgewiesen. Der Vergleich 5' flankierender Bereiche der analysierten Gene aus *M. vannielii* und *M. voltae* zeigt zwei konservierte Primär-Strukturelemente ("Box" A und "Box" B) mit folgender Sequenz:

Box A	Box B
5' ACCGAAA <u>AN</u> TTTATATA - 23 - 24 bp - TGC ^{3'}	

Der Transkriptionsstart erfolgt in jedem der analysierten Fälle am G der Konsensusbox B. Die Bindung der RNS-Polymerase aus *Methanococcus* an die Promotoren der Gene stabiler RNS schützt die unterstrichenen acht Basenpaare der Box A vor Abbau durch Exonuklease III, die geschützte Region erstreckt sich bis 16 Basenpaare "stromabwärts" des Transkriptionsstarts.

5. S1-Kartierungen zeigen, daß die Transkription des rRNS-Operons aus *M. vannielii* an einem Oligo-dT-Bereich unmittelbar nach dem 5S rRNS-Gen terminiert. Vergleichbare Primärstruktur motive sind 3' aller analysierter Transkriptionseinheiten für tRNS-Gene in *Methanococcus* zu finden.
6. Die Kartierungsanalysen bestätigen eine aufgrund von Sequenzvergleichen postulierte Signalstruktur für die endonukleolytische Prozessierung der rRNS-Vorläufertranskripte.
7. Aus *T. tenax* wurden fünf tRNS-Gene kloniert und sequenziert. Sie liegen alle in monocistronischen Transkriptionseinheiten. Vier der fünf tRNS-Gene besitzen Introns, teilweise an sehr unüblicher Stelle im Vorläufertranskript: in einem tRNS^{Leu}-Gen unterbricht das Intron die Anticodonsequenz und

in zwei tRNS^{Ala}-Genen liegt das Intron im Anticodonarm 5' zum Anticodon. Das in dieser Arbeit aufgestellte in vitro Transkriptionssystem für die Intron-enthaltenden tRNS^{Ala}- und tRNS^{Met}-Gene aus *T. tenax* wird in Zukunft nähere Analyse der Spleißreaktion in diesem thermophilen Archaeobakterium möglich machen.

8. Der Startpunkt der Transkription wurde an der Transkriptionseinheit der großen ribosomalen RNS-Gene (Leinfelder et al., 1985) und an zwei der tRNS-Gene aus *T. tenax* durch S1-Kartierung bestimmt. Die Analyse der flankierenden DNS-Bereiche zeigt, daß in einem Abstand von 18 bis 20 Basenpaaren vom Transkriptionsstart ein, in allen untersuchten Transkriptionseinheiten konservierter, AT-reicher Sequenzbereich liegt.
9. Der Vergleich der Promotorbereiche von Genen stabiler RNS aus *M. vanniellii* und *T. tenax* mit den entsprechenden Regionen anderer archaeobakterieller Gene erlaubt das Ableiten einer allgemeinen Konsensussequenz des archaeobakteriellen Promotors: In Genen methanogener, halophiler und schwefelabhängiger Archaeobakterien findet man in Position -25 zum Transkriptionsstart die konservierte Sequenz 5' TTTA_A^TATA³', zusätzlich ist das Tetranukleotid 5' _TATG^AC³' am Startpunkt der Transkription konserviert. Die Konsensus-elemente der archaeobakteriellen Promotoren besitzen große Ähnlichkeit mit den Promotoren, die von der eukaryontischen RNS-Polymerase II erkannt werden.
10. Eine Restriktionsendonuklease konnte im S100-Extrakt aus *T. tenax*-Zellen charakterisiert werden. Sie erkennt die DNS-Sequenz 5' GC_T^AGC³' und schneidet sie so, daß DNS-Enden entstehen, die 5' um drei Basen überhängen. Das Temperatur-optimum des Enzyms liegt zwischen 80°C und 90°C.

F. LITERATURVERZEICHNIS

A

- Abelson J (1979) Annual Rev. Biochem. 48: 1035-1069
- Aiba H, Adhya S, de Crombrugghe B (1981) J. Biol. Chem. 256: 11905-11910
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHC, Coulson AR, Drouin J, Eperon JG, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) Nature 290: 457-465

B

- Balch WE, Wolfe RS (1976) Appl. Environ. Microbiol. 32: 781-791
- Beauclerk AAD, Hummel H, Holmes DJ, Böck A, Cundliffe E (1985) Eur. J. Biochem. 151: 245-255
- Benson SA (1984) Bio Techniques, March/April: 66-67
- Berk AJ, Sharp PA (1977) Cell 12: 721-732
- Birnboim HC, Doly J (1979) Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523
- Böck A, Kandler O (1985) In: Woese CR, Wolfe RS (eds), Bacteria VIII: Archaeobacteria, Academic Press, Inc., New York: 413-452
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC (1977) Gene 2: 95-113
- Bollschweiler D, Kühn R, Klein A (1985) EMBO J. 4: 805-809
- Bonnard G, Francois M, Weil JH, Steinmetz A (1984) Mol. Gen. Genet. 194: 330-336
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) J. Mol. Biol. 41: 459-472
- Brock TD, Brock KM, Belley RT, Weiss RL (1972) Arch. Mikrobiol. 84: 54-68
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD (1981) J. Mol. Biol. 148: 107-127

C

- Casey J, Davidson N (1977) Nucleic Acids Res. 5: 1539
- Chant J, Dennis P (1986) EMBO J. 5: 1091-1097
- Chant J, Hui I, Jong-Wong D, Shimmin L, Dennis PP (1986) Syst. Appl. Microbiol. 7: 106-114

- Chatton E (1937) Titres et travaux scientifiques, Sete, Sottano, Italy
- Chen EJ, Seeburg PH (1985) DNA 4: 165-169
- Chu FK, Maley GF, Maley F, Belfort M (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3049-3053
- Clarke CG (1987) J. Mol. Evol. 25: 343-350
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114
- Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C, Chamben P (1980) Science 209: 1406-1414
- Covarrubias L, Cervantes L, Covarrubia A, Sobéron X, Vichido I, Blanco A, Kupersztoch-Portuoy YM, Bolivar F (1981) Gene 13: 25-35
- Culham DE, Nazar RN, Mol. Gen. Genet. (im Druck)

D

- Daniels CJ, Gupta R, Doolittle WF (1985) J. Biol. Chem. 260: 3132-3135
- Daniels CJ, Douglas SE, Doolittle WF (1986) System. Appl. Microbiol. 7: 26-29
- Dennis PP (1986) J. Bacteriol. 168: 471-478
- Deno H, Sugiura M (1983) Nucleic Acids Res. 13: 8407-8415
- Deutscher MP (1984) Crit. Rev. Biochem. 17: 45-71
- Dingermann T, Nerke K (1987) Anal. Biochem. 162: 466-475
- Doolittle WF, Darnell JE (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1271-1275
- Douglas C, Achatz F, Böck A (1980) Zbl. Bakt. Hyg. I., Abt. Orig. C1: 1-11

F

- Favaloro J, Treismann R, Kamen R (1980) Methods Enzymol. 65: 718-749
- Fox GE (1985) In: Woese CR, Wolfe RS (ed), Bacteria VIII: Archaeobacteria, Academic Press, Inc., New York
- Fox GE, Luehrsen KR, Woese CR (1982) Zbl. Bakt. Hyg. I., Abt. Orig. C3: 330-345
- Fox GE, Woese CR (1975) Nature 256: 505-507
- Fukada K, Abelson J (1980) J. Mol. Biol. 139: 377-391

G

- Gehrmann R, Henschen A, Postulka W, Klink F (1986) System. Appl. Microbiol. 7: 115-122
- Gray CP, Sommer R, Polke C, Beck E, Schaller H (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 50-53
- Green CJ, Vold BS (1983) Nucleic Acids Res. 11: 5763-5774
- Grunstein M, Hogness DS (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965
- Gupta R (1984) J. Biol. Chem. 259: 9461-9471
- Gupta R, Woese CR (1980) Curr. Microbiol. 4: 245-249

H

- Hamilton PT, Reeve JN (1985) Mol. Gen. Genet. 200: 47-59
- Hentschel C, Irminger JC, Buchner P, Birnstiel ML (1980) Nature 285: 147-151
- Hovemann B, Sharp S, Yamada H, Söll D (1980) Cell 19: 889-895
- Huet J, Schnabel R, Sentenac A, Zillig W (1983) EMBO J. 2: 1291-1294

J

- Jarsch M (1985) Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Jarsch M, Altenbuchner J, Böck A (1983) Mol. Gen. Genet. 189: 41-47
- Jarsch M, Böck A (1983) Nucleic Acids Res. 11: 7537-7544
- Jarsch M, Böck A (1985) Mol. Gen. Genet. 200: 305
- Johnson DA, Gantsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Gene Anal. Techn. 1: 3-8

K

- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3309-3312
- Kaine BP (1987) J. Mol. Evol. 25: 248-254
- Kandler O (1979) Naturwissenschaften 66: 95-105
- Kashdan M, Dudock B (1982) J. Biol. Chem. 257: 11191-11194
- Kelmers AD, Novelli DG, Stulberg MP (1965) J. Biol. Chem. 240: 3979-3984
- Kessler C, Höltke H-J (1986) Gene 47: 1-153
- Kjems J, Garrett RA (1987) EMBO J. 6: 3521-3530

- Kjems J, Leffers H, Garrett RA, Wich G, Leinfelder W, Böck A
(1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 4821-4835
- Kuchino Y, Watanabe S, Harada F, Nishimura (1980) *Biochemistry*
19: 2085-2089
- Kuchino Y, Ihara M, Yabasaki Y, Nishimura S (1982) *Nature* 298:
3309-3312

L

- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6955-6959
- Langworthy TA, Tornebene TG, Holzer G (1982) *Zbl. Bakt. Hyg.*
I., Abt. Orig. C3: 228-244
- Larson R, Messing J (1983) *DNA* 2: 31-35
- Larsen N, Leffers H, Kjems J, Garrett RA (1986) *System. Appl.*
Microbiol. 7: 49-57
- Laskowski MSr (1980) *Methods Enzymol.* 65: 263-276
- Lechner K, Wich G, Böck A (1985) *System. Appl. Microbiol.* 6:
157-163
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker (1977) *Biochemistry*
16: 4743-4751
- Leinfelder W, Jarsch M, Böck A (1985) *System. Appl. Microbiol.*
6: 164-170
- Leung DW, Lui ACP, Merilees H, McBride BC, Smith M (1979)
Nucleic Acids Res. 6: 17-25
- Linxweiler W, Hörz W (1982) *Nucleic Acids Res.* 10: 4845-4859
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *J. Biol.*
Chem. 193: 265-275
- Luehrsen KR, Fox GE (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:
2150-2155

M

- Ma DP, Doebley J (1986) *Gene* 43: 169-174
- Maaløe O, Kjeldgaard NO (1966) In: *Control of Macromolecular*
Synthesis, Benjamin, New York
- Makowski DR, Haas RA, Dolan KP, Grunberger D (1983) *Nucleic*
Acids Res. 11: 8609-8624
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning*;
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY

- Maxam AM, Gilbert W (1980) In: Grossmann L, Moldave K (eds)
Methods in Enzymology 65: 499-560
- McConnel DJ, Searcy DG, Sutcliffe JG (1978) Nucleic Acids Res.
5: 1729-1739
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green
MR (1984) Nucleic Acids Res. 12: 7035-7056
- Moritz A, Lankat-Buttgereit B, Gross HJ, Goebel W (1985)
Nucleic Acids Res. 13: 31-43
- Moss B (1981) In: Gene Amplification and Analysis, Chirikjian
JG and Papes TS, Vol. 2, 253-266, Elsevier North-Holland,
New York
- Müller B, Allmansberger R, Klein A (1985) Nucleic Acids Res.
12: 6537-6546

N

- Nakajima N, Ozeki H, Shinmura Y (1980) Cell 23: 239-249
- Neumann H, Gierl A, Tu J, Leibrock J, Staiger D, Zillig W
(1983) Mol. Gen. Genet. 192: 66-72
- Nishikawa K, Takemara S (1974) J. Biochem. 76: 935-947

O

- Ohme M, Kamogashira T, Shinozaki K, Sugiura M (1985) Nucleic
Acids Res. 13: 1045-1057
- Oliphant AR, Nussbaum AL, Struhl K (1986) Gene 44: 177-183
- Orozco jr. EM, Hallick RB (1982) J. Biol. Chem. 257: 3265-3275
- Østergaard C, Larsen N, Leffers H, Kjems J, Garrett R (1987)
System. Appl. Microbiol. 9: 199-209

P

- Peacock AG, Dingmann CW (1969) Biochemistry 7: 668-674
- Peden KWC (1983) Gene 22: 277
- Prangishvilli D, Zillig W, Gierl A, Biesert L, Holz I (1982)
Eur. J. Biochem. 122: 471-477
- Ptashne M, Backman K, Humayun MZ, Jefferey A, Maurer R, Meyer
B, Sauer RT (1976) Science 194: 156-161

R

- Reiter W-D, Palm P, Voos W, Kaniecki J, Grampp B, Schulz W,
Zillig W (1987) Nucleic Acids Res. 15: 5581-5595
- Rosen A, Sarid S, Daniel V (1984) Nucleic Acids Res. 12: 4893-
4909

- Rosenberg M, Court D (1979) *Ann. Rev. Genet.* 13: 319-353
Rossi JJ, Landy A (1979) *Cell* 16: 523-534
Rüther U (1980) *Mol. Gen. Genet.* 178: 475-477
Rüther U (1982) *Nucleic Acids Res.* 10: 5765-5769

S-Sch-Sp

- Saito H, Miura KJ (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 72: 619-629
Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
Schaffner M (1976) *Cell* 8: 471-478
Schmidt K, Thomm M, Laminet A, Laue FG, Kessler Ch, Stetter KO, Schmitt R (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 2619-2628
Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Söll D (1985) *Crit. Rev. Biochem.* 19: 107-144
Siebenlist U, Simpson RB, Gilbert W (1980) *Cell* 20: 269-281
Southern EM (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
Sprinzl M, Moll I, Weissner F, Hartmann T (1985a) *Nucleic Acids Res.* 13: r1-r50
Sprinzl M, Vorderwülbecke T, Hartmann T (1985b) *Nucleic Acids Res.* 13: r51-r105

T

- Thomm M, Stetter KO (1985) *Eur. J. Biochem.* 149: 345-351

U

- Ullrich A, Shine J, Chirwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, Goodman HM (1977) *Science* 196: 1313-1319

V

- Venkatesan S, Moss B (1981) *J. Virol.* 37: 738-747

W

- Weaver RF, Weissmann C (1979) *Nucleic Acids Res.* 7: 1175-1193
Whitman WB (1985) In: Woese CR, Wolfe RS (eds) *Bacteria VIII: Archaeobacteria*, Academic Press, Inc., New York: 1-84
Wich G (1984) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Wich G, Jarsch M, Böck A (1984) *Mol. Gen. Genet.* 196: 146-151
Wieslander C (1979) *Anal. Biochem.* 98: 305-309
Williams BG, Blattner FR (1980) *Genetic Engineering*, Vol. 2 (Setlow JK, Hollaender A eds), Plenum Press, NY, London
Woese C (1987) *Microbiol. Rev.* 51: 221-271

Woese CR, Magrum C, Fox GE (1978) J. Mol. Evol. 11: 245-252

Woese CR, Olsen GJ (1986) System. Appl. Microbiol. 7: 161-177

Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1963) J. Biol. Chem. 238: 2882-2886

Wu C (1985) Nature 317: 84-87

Y

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Gene 33: 103-119

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Böck bedanken. Seine vielen Anregungen, vielen Tips und Ratschläge und vor allem die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit, die er zu vermitteln wußte, waren für mich von großer Bedeutung.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Zillig für die großzügige Überlassung von Thermoproteus-Zellen sowie Herrn Dr. L. Sibold für die rekombinanten Klone, die er mir zur Verfügung stellte.

Frau Dr. Heidi Hummel und Herrn Dr. Michael Thomm danke ich für schöne und fruchtbare Zeiten wissenschaftlicher Zusammenarbeit. Die hervorragende Assistenz von Frau Ute Bär war mir bei zahlreichen Versuchen dieser Arbeit von großem Wert. Es hat Spaß gemacht, mit ihr zu arbeiten.

Es ist mir ein Anliegen, mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die vielen Tips, die interessanten Diskussionen und die jederzeit gewährte Hilfe zu bedanken. Die Freundschaft, die sie mir entgegenbrachten, war für mich wichtig. Insbesondere möchte ich Dagmar, Dorothea, Scarlett und Konrad danken; ich werde mich an unsere gemeinsame Zeit im "Großlabor" immer gerne zurückerrinnern.

Schließlich möchte ich noch Frau Margit Geier für die harten Stunden, die sie mit einer präzisen und schnellen Reinschrift dieser Arbeit verbrachte, herzlich danken.

LEBENS LAUF

Name: Günter W i c h

Geburtstag: 02.07.1958

Geburtsort: Günzburg

Eltern: Heinz Wich, Dipl. Ing. (FH)
Annelore Wich, Hausfrau

Schulbildung: 1964 bis 1968: Besuch der Grundschule
an der Rotbuchenstraße,
München.
1968 bis 1978: Erwerb der allgemeinen
Hochschulreife am Albert-
Einstein-Gymnasium (neu-
sprachl. Zweig), München

Studium: 1978 bis 1984: Studium der Biologie mit
Schwerpunkt Mikrobiologie,
an der Ludwig-Maximilians-
Universität München.
Abschluß: Diplom
Seit Okt. 1984: Promotion am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität
München unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. A. Böck.

